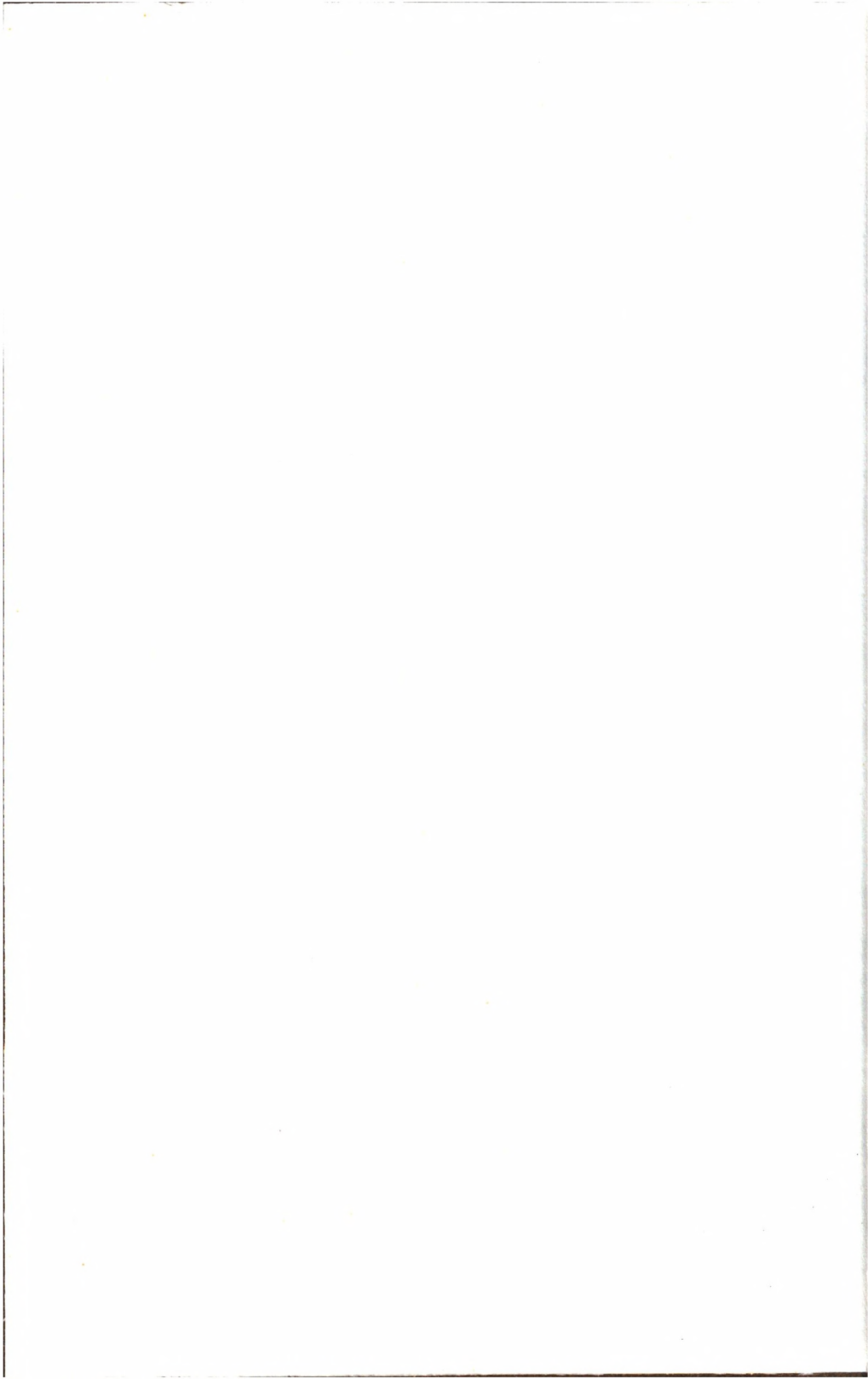


ВИРУСОЛОГИЯ

1



Издательство
«МИР»





Fundamental Virology

Chief Editors

BERNARD N. FIELDS, M. D.

The Adele Lehman Professor of
Microbiology and Molecular
Genetics
Professor of Medicine, and
Chairman,
Department of Microbiology and
Molecular Genetics
Harvard Medical School and
Brigham and Women's Hospital;
and The Shipley Institute of
Medicine Boston, Massachusetts

DAVID M. KNIPE, Ph. D.

Associate Professor of Microbiology
and Molecular Genetics
Department of Microbiology and
Molecular Genetics
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Associate Editors

ROBERT M. CHANOCK, M. D.

Laboratory of Infectious Diseases
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland

JOSEPH L. MELNICK, Ph. D.

Department of Virology and
Epidemiology Baylor College of
Medicine Texas Medical Center
Houston, Texas

BERNARD ROIZMAN, Sc. D.

Department of Molecular Genetics
and Cell Biology
University of Chicago
Chicago, Illinois

ROBERT E. SHOPE, M. D.

Department of Epidemiology and
Public Health
Yale University School of
Medicine
New Haven, Connecticut

RAVEN PRESS. NEW YORK

ВИРУСОЛОГИЯ

В 3-х томах

I

Под редакцией Б. ФИЛДСА, Д. НАЙПА
при участии
Р. ЧЕНОКА, Б. РОЙЗМАНА, ДЖ. МЕЛНИКА,
Р. ШОУПА

Перевод с английского
канд. биол. наук А. В. ГУДКОВА,
канд. физ.-мат. наук Л. В. МАЛИНИНОЙ,
д-ра мед. наук Е. И. СКЛЯНСКОЙ,
канд. биол. наук К. М. ЧУМАКОВА

под редакцией
проф. Н. В. КАВЕРИНА,
проф. Л. Л. КИСЕЛЕВА



Москва «Мир» 1989

ББК 28.4
В52
УДК 578

Авторы: Филдс Б. Н., Найп Д. М., Мэрфи Ф. А., Харрисон С., Уайли Д., Ройзман Б., Холланд Д. Дж., Рэмиг Р. Ф., Шоуп Р., Кауфман Р., Пенмен Ш., Грин М., Лоуи Д. Р.

Вирусология: В 3-х т. Т. 1: Пер. с англ./Под ред. Б. Филдса, В52 Д. Найпа, при участии Р. Ченока, Б. Ройзмана, Дж. Мелника, Р. Шоупа. — М.: Мир, 1989. — 492 с., ил.
ISBN 5-03-000283-9

Фундаментальное руководство по вирусологии, написанное известными специалистами из США и Англии. Книга может служить учебным и справочным пособием. На русском языке выходит в 3-х томах.

В первом томе рассмотрена таксономия вирусов, структурная организация, репродукция, общая и молекулярная генетика, эпидемиология и патогенез вирусных инфекций, трансформация клеток и онкогенез.

Для вирусологов, молекулярных биологов, медиков, а также студентов и аспирантов, специализирующихся в области вирусологии.

В 1905000000—218
041(01)—89 103—89, ч. 1

ББК 28.4

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-000283-9 (русск.)
ISBN 5-03-000282-0
ISBN 0-88167-211-4 (англ.)

© 1986 by Raven Press Book, Ltd.

© перевод на русский язык, «Мир», 1989

Предисловие редакторов перевода

Все возрастающий интерес к вирусам — мельчайшим объектам жизни, стоящим на самой границе между живым и неживым и не способным к проявлению каких-либо признаков живого вне клеток, обусловлен, как нам кажется, двумя главными причинами. Первая заключается в том, что вирусы являлись в прошлом и остаются до сих пор одними из главных возбудителей многих инфекционных и неинфекционных заболеваний. Достаточно напомнить читателям, что черная оспа, уносившая в прошлом миллионы жизней и побежденная в наши дни, является вирусным заболеванием, известным человечеству тысячелетия. Вирусную природу имеет и массовое заболевание наших дней — грипп, который до сих пор, несмотря на огромные усилия исследователей многих стран мира, не может считаться побежденным. Можно напомнить, что еще 20 лет назад вирус, вызывающий тяжелое заболевание нервной системы — полиомиелит — представлял серьезную опасность, в особенности для детей. Сейчас общепризнано, что существуют вирусы, непосредственно вовлеченные в образование опухолей у человека и животных. Что касается вирусов растений, то вызываемые ими болезни уносят миллионы тонн сельскохозяйственных продуктов и заметно уменьшают продовольственные ресурсы человечества.

Сказанного было бы достаточно, чтобы оправдать то неослабное внимание, которое уделяют изучению вирусов несколько поколений биологов. Однако дело не исчерпывается огромной практической важностью вирусов для здравоохранения, ветеринарии и растениеводства. Как показал опыт последних 2—3-х десятилетий, вирусы являются незаменимыми, самой природой созданными объектами и моделями, помогающими решать общие биологические, генетические, биохимические, молекулярно-биологические, эволюционные и ряде других проблем. Так, выяснение фундаментальных принципов репликации, транскрипции, трансляции и способов регуляции генной активности, а также расшифровка генетического кода, структур белков и нуклеиновых кислот — все это делалось и продолжает делаться при постоянном использовании как целых вирусных частиц, так и их отдельных компонентов. Можно без преувеличения сказать, что

ни один биолог не может считать себя достаточно образованным, если он не знаком с основами вирусологии в ее современном виде.

Дело не только в том, что вирусология поставляла и продолжает поставлять почти идеальные объекты исследования смежным научным дисциплинам и тем самым значительно их обогащает. Сама вирусология, широчайшим образом заимствуя идеи и методы смежных научных направлений (генетики, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии и т. д.), получила возможность быстрого и высокоэффективного развития. По существу за последние 15—20 лет большинство разделов вирусологии было переписано заново.

В предлагаемой вниманию читателя книге подведены итоги этой методической эволюции и дана современная картина вирусологии как науки во всей полноте и объеме. В последние годы отечественная научная литература почти не пополнялась книгами по общей и частной вирусологии, поэтому выход в свет этого трехтомника существенным образом восполняет имеющийся пробел. Эту книгу можно с полным правом назвать энциклопедией вирусологии, и мы надеемся, что читатель согласится с подобным определением. Энциклопедичность этого труда определяется тем, что в нем совмещено рассмотрение общих проблем вирусологии, таких как структура вирионов, механизмы репликации, пути распространения вирусов и т. д., и частных характеристик отдельных групп вирусов (частная вирусология). Такое построение книги позволяет читателю выбрать ту главу или тот раздел, который ему необходим в данный момент. Другими словами, возможно избирательное чтение отдельных глав без обязательного прочтения предшествующих разделов.

Разные главы написаны различными авторами, и преимущества подобного разделения труда очевидны, поскольку при этом каждую главу пишет специалист, признанный в соответствующей области. Вместе с тем, благодаря определенным принципам, которых придерживались все авторы, книга воспринимается как единое целое и не страдает от сильного разноречия авторских стилей и манер изложения.

Очевидно, в первую очередь книга понадобится студентам и аспирантам биологических, медицинских и частично химических факультетов университетов и соответствующих институтов. Вместе с тем она будет безусловно полезна и научным сотрудникам.

Конечно, вирусология стремительно развивается, и справедливости ради следует упомянуть о том, что в самое последнее время в разных разделах вирусологии получены интересные результаты, которые еще не удалось отразить в этой книге. Однако такова судьба любой монографии в любой быстро развивающейся науке. Важно другое: основные сведения, основная иде-

логия, основные факты и наблюдения и их интерпретация остаются в полной мере достоверными, актуальными и сохраняют свое значение как фундамент общей и частной вирусологии. Мы надеемся, что читатели по достоинству оценят широту и глубину этого фундаментального труда, отдадут должное авторам и переводчикам и с большой пользой будут обращаться к этой книге многие годы. К сожалению, в книге совсем не освещен вопрос о вирусе СПИДа. Тем, кто им интересуется, советуем прочитать № 12 журнала «В мире науки», — М.: Мир, 1988, целиком посвященный проблемам СПИДа.

Книгу перевели А. В. Гудков (предисловие, гл. 13, 19, 20, 23, 24, 28), Л. В. Малинина (гл. 1, 3, 11, 12, 25—27, 29, 30), Е. И. Склянская (гл. 4—6, 9, 10, 14, 16, 17, 31, 32) и К. М. Чумаков (гл. 2, 7, 8, 15, 18, 21, 22, 33).

*Н. В. Каверин
Л. Л. Киселев*

В последнее десятилетие революция, начавшаяся с открытия роли ДНК в передаче наследственной информации, продолжала приносить свои плоды. На первых этапах этого периода главным объектом исследований были наиболее просто устроенные вирусы бактерий — бактериофаги. Позже столь же плодотворную роль в развитии молекулярной генетики эукариот сыграли вирусы животных. В то же время, когда на этих объектах делались по существу фундаментальные открытия, происходили изменения в структуре самих природных вирусных инфекций: исчезла оспа и появился СПИД. Все более широкое распространение иммуносупрессии привело к возрастанию роли «естественных», или латентных, вирусов в патогенезе. В настоящее время распространение многих классических вирусных инфекций (полиомиелита, кори, краснухи) в значительной степени ограничено широким применением эффективных вакцин, тогда как распространение других (например, вызываемых респираторно-синцитиальным вирусом) все еще не поддается эффективной профилактике.

Замечательные открытия в молекулярной биологии сопровождались формированием новых представлений о вирусах как инфекционных агентах. Были найдены принципиально новые пути создания вакцин, а в биохимических исследованиях удалось ответить на многие классические вопросы эпидемиологии и патогенеза вирусных болезней. Целью первого варианта учебника («*Virology*») ¹ было собрать воедино все аспекты вирусологии и представить их в более исчерпывающем виде, чем это обычно делается. Таким образом, он планировался как справочник для студентов и выпускников медицинских институтов, а также для научных сотрудников, экспериментаторов и врачей, интересующихся биологией вирусов.

Представляемая нами на суд читателя книга состоит из глав, отобранных из «*Virology*». Она предназначена для студентов старших курсов и выпускников институтов, научных сотрудников,

¹ *Virology*, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, D. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope, Raven Press, 1985.

исследователей-экспериментаторов, интерес которых направлен скорее на фундаментальные, чем на клинические или прикладные аспекты вирусологии. Во вводных главах обсуждаются основные вопросы общей вирусологии, а в последующих представлены сведения о биохимии, молекулярной биологии и клеточных аспектах репликации различных групп вирусов. Книгу будет весьма полезно использовать в курсах общей и молекулярной вирусологии.

*Бернард Н. Филдс
Дэвид М. Найп*

Благодарности

Эта книга — результат труда многих людей. Нам бы хотелось особо поблагодарить Розмари Бэкко и Филлис Коэн-Гарлэнд из Гарвардской медицинской школы за их помощь в ее подготовке. С самого начала нас поддерживала доктор Диана Шнейдер из Рейвен Пресс, благодаря чему нам удалось достичь намеченной цели. Мы также благодарны Ровене Хауэллс за ее неоценимую помощь в издании «Virology»¹. Кроме названных, выполнить задуманное редакторам и авторам помогли многие другие. Хотя у нас нет возможности перечислить их здесь или в отдельных главах, мы глубоко признательны всем, чей труд способствовал появлению этой книги.

¹ См. сноску на с. 8.

Введение

*Бернард Н. Филдс, Дэвид М. Найп*¹

Введение в вирусологию животных

Вирусы — это реплицирующиеся микроорганизмы, одни из мельчайших представителей существующего многообразия форм жизни. Простота организации вирусов обуславливает их главную особенность, которая заключается в том, что они размножаются только внутри клеток-хозяев и находятся в сильной зависимости от их структуры и метаболизма. Хотя в последние годы вирусологи затратили много усилий, чтобы понять, как происходит это размножение, до сих пор вирусы являются основной причиной болезней человека.

Вирусные болезни — один из главных бичей человечества. К ним относятся оспа, желтая лихорадка, бешенство, полиомиелит и др. Несмотря на успехи профилактики и почти полную ликвидацию наиболее опасных, смертельных вирусных заболеваний человека, вирусы тем не менее остаются самой распространенной причиной человеческих недугов, например острых респираторных и желудочно-кишечных заболеваний, а также таких серьезных хронических болезней, как гепатит и генитальный герпес.

Указанные заболевания имеют ясные и легко наблюдаемые симптомы. Однако известно, что многие вирусные инфекции протекают без внешних симптомов (т. е. имеется бессимптомная форма инфекции). Это означает, что следует различать понятия инфекции (размножения вируса в зараженном хозяине) и заболевания (нарушений в организме из-за размножения вируса, приводящего к повреждению тканей). Для некоторых вирусных инфекций размножение вируса без явных признаков заболевания (инаппарантная инфекция) нехарактерно или даже никогда не встречается. Примером такого рода является вирус кори. Вместе с тем в других случаях, напротив, на 100 или более боль-

¹ *Bernard N. Fields and David M. Knipe*, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115.

ных с инаппарантной инфекцией приходится лишь один больной с клиническими проявлениями.

Кроме того, что большинство вирусных инфекций инаппарантны, многие из вирусов могут вызывать болезни нескольких клинических типов. При этом может затрагиваться не один орган, а несколько (мозг, дыхательные пути), а форма заболевания может варьировать от слабой до скоротечной и смертельной. Дополнительная трудность при клинической диагностике вирусных заболеваний состоит в том, что одну и ту же клиническую картину (например, острый респираторный синдром) могут давать разные вирусы. Таким образом, чтобы с определенностью установить этиологию каждого индивидуального заболевания, абсолютно необходимы лабораторные исследования, даже если клинические данные достаточно очевидны.

Вирусология в значительной степени занимается изучением вирусов, вызывающих болезни у человека. Кроме того, вирусы сыграли очень важную роль в установлении основных законов современной биологии. Например, они были использованы как простые генетические системы для изучения структуры и функции генов, т. е. их значение в истории молекулярной биологии трудно переоценить. Цель этой книги — представить обширные современные данные, касающиеся как медицинских, так и молекулярных характеристик тех вирусов, которые важны для медицины.

Вирусология — новая область науки. Следует отметить, что в XIX в. до разработки бактериологических методов все инфекционные агенты называли вирусами. Одним из немногих доступных методов изучения причин заразных болезней было введение неочищенных материалов, полученных от больных. Только благодаря работам Коха, который впервые использовал технику чистых бактериальных культур, появилась возможность выделить бактерии — возбудителей многих инфекционных заболеваний. После того как было установлено, что этиологическими агентами инфекционных болезней являются бактерии, стало возможным различать бактериальные и небактериальные заболевания. В сущности наиболее ранние описания агентов, которых можно рассматривать как вирусы, появились после развития представлений о фильтрующихся возбудителях. Такие возбудители были инфекционны, но их не удавалось идентифицировать с помощью бактериальных методов, доступных в конце XIX в. Их отличительной особенностью являлось то, что они сохраняли инфекционность после прохождения через фильтры, задерживающие бактерии.

История методов и концепций в вирусологии

Системы животного-хозяина

Чтобы осознать происходящий в XX столетии прогресс в понимании того, что такое вирусы, следует подробно обсудить методы, используемые в вирусологии с конца XIX в. и до настоящего времени, а также рассмотреть концепции, которые сыграли роль в этом понимании.

Пастер был первым, кто начал (1881 г.) систематически использовать лабораторных животных в работах по изучению вируса бешенства [22]. Его исследования по инокуляции материала, полученного от больных бешенством, в мозг кролика были провозвестниками более поздних экспериментов, в которых вирусные агенты стали вводить непосредственно в высоковосприимчивый к заболеванию орган или ткань. Другая важная веха на рубеже столетия — это опыты Военной комиссии США по желтой лихорадке, которыми руководил Уолтер Рид [23]. В них было установлено, что вирус желтой лихорадки — первый обнаруженный вирус человека — присутствует в крови больного в течение первых трех дней лихорадки, что вирус может передаваться при укусе комара и что прежде, чем комар приобретает способность передавать инфекцию, должно пройти определенное время. Так появилось представление о внешнем инкубационном периоде. После этого прошло более 30 лет, когда Макс Тейлор, положивший начало современному этапу работ над желтой лихорадкой, усовершенствовал и ввел в систему использование в качестве восприимчивых животных-хозяев мышей [32]. Развитие его подхода в конечном итоге привело к получению других вирусов, причем кульминацией в этом цикле работ стало выделение Далдорфом и Сайклзом в 1948 г. группы вирусов эпидемической миалгии на мышах-сосунках [7]. В начале тридцатых годов кроме мышей стали использовать также куриные эмбрионы, т. е. появился еще один источник тканей, чувствительных к заражению вирусами и способных поддерживать их размножение, особенно подходящий для группы поксвирусов.

По мере того как появлялись и совершенствовались все эти экспериментальные системы, развивались количественные методы исследований. К ним относится тестирование на людях лимфы, содержащей вирус осповакцины, которое начали проводить с 1920 г., а также методы определения других вирусов, разработанные после появления работы Гарви и Актона с вирусом бешенства в 1923 г. [12].

Культура клеток

Развитие вирусологии очень сильно зависело от разработки метода культур клеток, которые сначала появились в конце 20-х годов, а затем в 40-х годах были применены для исследования вирусов энцефалитов. В 1949 г. в ключевом эксперименте Эндерса и др. [11] было показано, что культуры клеток способны поддерживать рост вируса полиомиелита. Это открытие возвестило о приходе эры современной вирусологии и послужило толчком к ряду исследований, которые в конечном итоге привели к выделению многих вирусов, вызывающих серьезные заболевания у человека. Таким образом, 50-е и 60-е годы стали золотым веком медицинской вирусологии. Выделение ряда энтеровирусов (Коксаки, ЕСНО) и респираторных (адено-, респираторно-синциального) вирусов привело к тому, что были установлены причины большого числа болезней, вирусное происхождение которых до того момента лишь предполагали. Параллельно с этими медицинскими исследованиями после 1952 г., когда Дульбекко применил к вирусам животных метод бляшек (негативных колоний) [10], в количественную вирусологию вошли системы культур ткани. Метод бляшек был прямым продолжением исследований, проводившихся на бактериях и бактериофагах.

Бактериальные вирусы и генетика бактерий

В 1917 г. было обнаружено, что бактерии могут заражаться вирусами, т. е. были открыты бактериальные вирусы — бактериофаги. Д'Эррель считал [9], что заражение бактерий вирусами может оказаться полезным в лечении болезней, но ему так и не удалось доказать эту идею или убедить своих коллег в возможности своей правоты. Однако его открытие бактериофагии было оценено в конце 30-х годов, когда группа ученых занялась исследованием бактериофагов, используя их как удобную модель для изучения взаимодействий вирус — клетка в точных биохимических и генетических терминах. Дельбрюк, Луриа и другие ввели количественную методологию и разработали системы для изучения литических взаимодействий бактериофага и клетки, что помогло уточнить понятие мутации; они развили методы и подходы, позволившие в полной мере определить очень важные генетические понятия [8, 20]. Затем Херши и Чейз доказали, что генетическая информация бактериальных вирусов закодирована в их нуклеиновых кислотах [13]. Вслед за этим было установлено, что вирусы содержат либо РНК, либо ДНК. В процессе исследований заражения бактерий бактериофагами были сформулированы многие принципы, на которых основана современная молекулярная биология. Оказалось, что кроме литических взаи-

модействий, при которых бактериальные вирусы вызывают лизис зараженных бактерий, существует вегетативная вирусная инфекция — понятие, введенное Львовым [21], — при которой фаг входит в бактерию-хозяина, не вызывая лизиса. Это явление лизогении, или пассивной инфекции, дало возможность понять, как происходит встраивание вируса в хромосомы хозяина, и тем самым представить, как могут встраиваться в хромосомы клетки-хозяина опухолеродные вирусы.

Эти исследования фагов находились в центре той революции в биологии, которая привела к возникновению молекулярной биологии. Если до сих пор в классических генетических работах биохимические приемы не использовались, то именно применение бактериофагов в качестве генетического инструмента позволило объединить генетику и биохимию в молекулярную биологию. После открытия структуры ДНК в 50-х годах бактериофаги неоднократно играли ключевую роль в разработке новых представлений и методов для изучения организации генома, транскрипции ДНК, трансляции мРНК, генетического кода и в последнее время в качестве векторов для рекомбинантных ДНК. Методические разработки, использующие генетику, привели к полной расшифровке (секвенированию) вирусных генов и такому уровню понимания, о котором незадолго до этого можно было только мечтать.

Индукция опухолей вирусами

Представление о том, что возникновение опухолей может быть связано с вирусами, появилось после того, как было обнаружено, что вирус саркомы Рауса вызывает опухоли у кур [24] и что вирусы присутствуют в опухолях ряда млекопитающих [29]. Впоследствии было показано, что и другие вирусы могут вызывать опухоли у мелких грызунов и других видов животных. Более того, недавно получено прямое доказательство того, что вирусные агенты служат причиной появления опухолей у человека (гл. 32). Компоненты вирусов, ответственные за возникновение опухолей, называют вирусными онкогенами.

Эта область исследований имеет значение как для молекулярной биологии эукариотических клеток, так и для лечения болезней человека. Вирусные онкогены оказались в числе лучших модельных систем, помогающих изучению механизмов онкогенетической трансформации клеток млекопитающих [2] (гл. 12, 13). Работы с вирусными онкогенами позволили определить роль и значение протеинкиназ и ядерных белков в регуляции клеточного роста [5]. Обнаружение того факта, что клетки опухолей человека имеют мутации в тех генах, которые в значительной степени сходны с генами, используемыми РНК-содержащими онкогенными вирусами для трансформации клеток, способствовало выяснению

вопроса о том, какие дефекты в опухолевых клетках ответственны за индукцию опухолей. Изучение этих «клеточных онкогенов» — новая важная ветвь онкологии и едва ли не самая волнующая область в исследованиях рака [19, 28].

Биохимия и молекулярная биология

Исторически сложилось так, что большую часть усилий вирусологи затратили на идентификацию вирусов различных болезней — они изучали патологию болезни и определяли, является ли ее возбудителем вирус. Однако вирусы растений и животных сыграли важную роль не только в тех областях, где непосредственно изучают болезни человека и животных, но и в смежных с ними, например в биохимии.

В 1935 г. был закристаллизован один из вирусов растений — вирус табачной мозаики — и это послужило толчком к тому, чтобы рассматривать вирусы как простой комплекс химических веществ, состоящий из белка и рибонуклеиновой кислоты [30]. Вскоре появились кристаллы других вирусов растений, но первый вирус человека — вирус полиомиелита — закристаллизовали только в 1955 г. И лишь в 80-х годах удалось выяснить тонкие детали строения некоторых из этих кристаллических структур и от них перейти к объяснению структуры и функций важных вирусных белков. Например, стала возможной кристаллизация индивидуальных вирусных белков, таких как гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа, а также кристаллизация целого интактного вириона — вируса кустистой карликовости томата (гл. 3 и 4). Эти исследования привели к выяснению связи между биохимическими свойствами отдельных белков и точной физической структурой и функцией целого вириона.

В 60-е годы появился метод центрифугирования в градиенте плотности. С его помощью исследователи научились получать вирусы в чистом виде и идентифицировать их составляющие, что способствовало более подробному изучению путей сборки вирусной частицы. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле позволил разделить белковые смеси. Первоначально это было сделано с вирусом полиомиелита, а затем с более сложными вирусами и культивируемыми клетками.

В 50-е годы вирусную частицу считали чем-то вроде «тюка», набитого нуклеиновыми кислотами и белками. Однако представление об инертной вирусной частице противоречило данным о наличии нейраминидазной активности у вируса гриппа и о содержании лизоцимоподобных ферментов в хвостах бактериофагов. В 60-х и начале 70-х годов был открыт ряд ферментов вирусов, в том числе РНК-полимераза у вируса осповакцины и РНК-содержащих вирусов [16]. Самый замечательный фермент

был обнаружен у ретровирусов — это обратная транскриптаза (ревертаза), способная синтезировать ДНК на РНК-матрице [1, 31]. И наконец, совсем недавно были обнаружены ферменты, осуществляющие кэппинг мРНК [27].

Изучение экспрессии генов у вирусов эукариот современными методами биохимии нуклеиновых кислот дало также фундаментальную информацию о молекулярной биологии самих эукариот. Например, наличие полиадениловой последовательности на 3'-конце мРНК [15] и сплайсинг [1a] впервые выявили у вирусов животных. Сигнальные последовательности, регулирующие транскрипцию и трансляцию эукариотических мРНК, в ряде случаев впервые были определены для вирусных мРНК [18].

Электронная микроскопия и ультраструктура

Хотя «споры микрококков» в лимфе, содержащей вирус оспы, были обнаружены еще в 1886 г., сложную структуру вируса удалось описать только в 1940 г. [25] благодаря применению электронной микроскопии. Конечно, на ранних стадиях электронно-микроскопических исследований детали ультраструктуры вирусных частиц установить не удалось. Однако были измерены размеры вирусных частиц, которые затем сравнили с размерами, полученными с помощью фильтрации и других методов. Несмотря на некоторое расхождение результатов, стало ясно, что самые большие вирусы немногим меньше бактерий, тогда как самые маленькие чрезвычайно малы. Существенным достижением было появление метода негативного контрастирования, который позволил проводить анализ нефиксированных препаратов и неочищенных вирусных суспензий [3]. К этому времени были сформулированы основные принципы сборки вирусов, а также выяснилось, что вирусные капсиды бывают спиральными и икосаэдрическими [4, 6].

Одна из интересных возможностей электронной микроскопии в этой области исследований была оценена лишь впоследствии, когда удалось применить этот метод для идентификации «капризных» по своим ростовым свойствам вирусов, таких как возбудители вирусных гастроэнтеритов (ротавирусы и норуковский агент) и гепатита. Кроме того, именно электронная микроскопия сыграла главную роль в идентификации этиологических агентов подострого склерозирующего панэнцефалита и прогрессирующего очагового лейкоэнцефалита.

Иммунология

Вирусологи считают одной из своих задач поиск путей предотвращения вирусных заболеваний. По мере решения этой задачи развивались представления о двух формах иммунитета хо-

зяина — гуморального и клеточного. В начале двадцатого столетия методы иммунологии играли важную роль в классификации вирусов и изучении природы противовирусного иммунитета. При этом особо следует отметить три метода. Первый — это гемагглютинация — важный иммунологический метод для быстрой идентификации вирусного агента, открытый Хирстом в 40-е годы [14]. С помощью гемагглютинации, или склеивания эритроцитов, можно производить быструю проверку на присутствие вируса, поверхностные белки которого вызывают агглютинацию эритроцитов. Этот метод сыграл важную роль в изучении вирусов и в развитии методов их количественного определения так же, как и радиоиммунный анализ, который появился в 60-е годы и сразу же стал мощным инструментом быстрой высокочувствительной идентификации и анализа вирусов иммунологическими средствами. И наконец, с помощью появившихся в последнее десятилетие моноклональных антител возникла возможность идентифицировать специфические области (эпитопы) вирусных белков; благодаря этому в руках у исследователей оказался чрезвычайно специфический тест на индивидуальные вирусные белки [17].

Важное влияние на развитие вирусологии оказывают также исследования, связанные с культивированием и клонированием различных Т-лимфоцитов. Возможность культивирования Т-клеток позволила иммунологам определить роль клеток различных типов в защите против вирусных инфекций. Кроме того, в руках исследователей оказались и сами Т-клетки, которые очень удобно использовать для выделения и идентификации вирусов, растущих в лимфоидных клетках данного типа (например, вирус Т-клеточного лейкоза человека) (гл. 32). Сочетание моноклональных антител с методами молекулярного клонирования и рекомбинантных ДНК привело к возникновению нового подхода, с помощью которого был выделен и идентифицирован рецептор Т-клеток [26]. Совершенно очевидно, что это позволит в конечном счете точно идентифицировать функции и специфичность узнавания различных Т-клеток.

Профилактика и лечение

Хотя в вирусологии развиваются разные методы и изучаются разные проблемы (от самых фундаментальных, связанных со структурой и функциями макромолекул, до самых практических, связанных с распознаванием вирусных агентов, вызывающих различные болезни), ясно, что одной из главных целей вирусологии является профилактика и лечение вирусных заболеваний и, конечно же, именно эта цель особенно важна для практической медицины. Первая вакцина для людей, созданная Дженне-

ром против оспы 200 лет назад, привела в конце концов к ликвидации этого вирусного заболевания. Другие вакцины, например вакцина против желтой лихорадки, позволили снизить уровень эпидемических заболеваний. Некоторые вакцины — против полиомиелита, кори, свинки и краснухи — радикально изменили форму и ослабили течение болезней. Тем не менее не секрет, что имеется еще целый ряд вирусных агентов, против которых нет эффективных вакцин (например, против респираторно-синцитиального вируса), или что вакцины имеют ограниченное применение (например, вакцины против вируса гепатита). В 80-е годы появились новые подходы, вселяющие в вирусологов большие надежды на создание новых противовирусных вакцин (гл. 17). Это, в частности: а) рекомбинантные ДНК, продуцирующие индивидуальные белки; б) вставки в такие вирусы, как вирус оспы, вакцины и вирус герпеса, генов, которые могут кодировать дополнительные иммуногенные белки; в) имитация вирусов с использованием иммунологических средств или «антиидиотипов». Все эти подходы, как было показано, при различных экспериментальных условиях могут в принципе привести к созданию вакцин. Вероятно, мы стоим на пороге новой эры — эры новых, более безопасных вакцин. Многие методы, ранее применяемые только в фундаментальных исследованиях, теперь все чаще применяются для выяснения вопроса о том, как осуществляется вирусная инфекция, причем исследуется этот вопрос на самом высоком уровне. Вероятно, по мере того как эти исследования будут охватывать все большее количество вирусов, будут появляться и новые идеи о способах лечения вирусных заболеваний. Хотя вирусные заболевания, вообще говоря, более устойчивы к химиотерапии, чем бактериальные, в последние годы показано, что некоторые лекарственные препараты обладают эффективным противовирусным действием. Тем не менее в фундаментальной и медицинской вирусологии остается масса проблем, которые должны разрешить в будущем вирусологи.

Литература

1. *Baltimore D.* (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses, *Nature*, **226**, 1209—1211.
- 1а. *Berget S. M., Moore C., Sharp P. A.* (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 3171—3175.
2. *Bishop J. M.* (1981). Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes, *Cell*, **23**, 5—6.
3. *Brenner S., Horne R. W.* (1959). A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses, *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103—110.
4. *Caspar D. L. D., Klug A.* (1962). Physical principles in the construction of regular viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1—24.
5. *Collett M. S., Erikson R. L.* (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma SRC gene product, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2021—2024.

6. Crick F. H. C., Watson J. D. (1956). Structure of small viruses, *Nature*, **177**, 473—475.
7. Dalldorf G., Sickles G. M. (1948). All unidentified filterable agent isolated from the faeces of children with paralysis, *Science*, **108**, 61—63.
8. Delbruck M. (1940). The growth of bacteriophage and lysis of the host, *J. Gen. Physiol.*, **23**, 643.
9. D'Herelle F. (1921). *Le Bacteriophage*, Masson, Paris.
10. Dulbecco R. (1952). Production of plaques in monolayer tissue cultures caused by single particles of an animal virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **38**, 747—752.
11. Enders J. F., Weller T. H., Robbins F. C. (1949). Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues, *Science*, **109**, 85—87.
12. Harvey W. F., Acton H. W. (1923). An examination into the degree of efficiency of antirabic treatment, *Indian J. Med. Res.*, **10**, 1020—1046.
13. Hershey A. D., Chase M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.*, **36**, 39—56.
14. Hirst G. K. (1941). The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus, *Science*, **94**, 22—23.
15. Kates J. (1970). Transcription of the vaccinia virus genome and the occurrence of polyribonucleic acid sequences in messenger RNA, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, **35**, 743—752.
16. Kates J., McAuslan B. R. (1967). Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 314—328.
17. Kohler G., Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity, *Nature*, **256**, 495.
18. Kozak M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, **15**, 1109—1123.
19. Krontiros T. C., Cooper G. M. (1981). Transforming activity of human tumor DNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1181—1184.
20. Luria S. E. (1950). Bacteriophage: an essay on virus reproduction, *Science*, **111**, 507—511.
21. Lwoff A. (1957). The concept of virus, *J. Gen. Microbiol.*, **17**, 239—253.
22. Pasteur L., Chamberland C., Roux E. (1884). *Physiologie experimentale: nouvelle communication sur le rage*, *C. R. Acad. Sci.*, **98**, 457—463.
23. Reed W. (1902). Recent researches concerning the etiology, propagation, and prevention of yellow fever by the United States Army Commission, *J. Hyg.*, **2**, 101—119.
24. Rous R. (1911). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate, *JAMA*, **56**, 198.
25. Ruska H. (1940). Die Sichtbarmachung der Bacteriophagen Lyse in Ubermikros., *Naturwissenschaften*, **28**, 45—46.
26. Saito H., Kranz D. M., Takagaki Y., Hayday A. C., Eisen H., Tonegawa S. (1984). Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences, *Nature*, **309**, 757—762.
27. Shatkin A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs, *Cell*, **9**, 645—650.
28. Shih C., Padhy L. C., Murray M., Weinberg R. A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts, *Nature*, **290**, 261—264.
29. Shope R. E. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits, *J. Exp. Med.*, **58**, 607—624.
30. Stanley W. M. (1935). Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus, *Science*, **81**, 644—654.
31. Temin H. M., Mizutani S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, *Nature*, **226**, 1211—1213.
32. Theiler M., Smith H. H. (1937). The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization, *J. Exp. Med.*, **65**, 787—800.

Таксономия вирусов

Фредерик А. Мэрфи¹

«Мир, — сказал Поль Вальери, — в равной мере находится во власти двух стихий: порядка и беспорядка.» Вирусология тоже.

Львов, Хорн, Турнье, 1962

Предыстория

Вирусы были открыты в конце прошлого столетия Бейерингом и Ивановским (вирус табачной мозаики), Леффлером и Фрошем (вирус ящура) и Ридом и Кэрролом (вирус желтой лихорадки). В основе этого открытия лежало измерение единственной физико-химической характеристики вирусов — фильтруемости [28]. В сущности это была такая оценка размера вирусов, которая ставила их особняком от «микробов». В то время определение других физико-химических свойств было невозможным, и большинство исследований было направлено на изучение инфекционного процесса и реакции на него со стороны организма-хозяина. Поэтому первые попытки классификации вирусов основывались на сходстве их патогенных свойств (например, «вирусы гепатита» включали возбудителей, известных теперь как вирусы гепатита А, гепатита В и вирус желтой лихорадки), органотропности (например, «респираторные вирусы» включали такие агенты, как вирусы гриппа, риновирусы, аденовирусы), а также на общности экологического статуса (например, «арбовирусами» ранее называли возбудителей, которые теперь известны как тогавирусы, буньявирусы и рабдовирусы). Становление вирусологии началось в 30-х годах с фундаментальных работ, посвященных изучению природы вирусов, но вплоть до 50-х годов биохимические и морфологические данные об этих агентах были слишком разрозненными, чтобы послужить основой для их классификации. В начале 50-х годов была предпринята первая попытка сгруппировать вирусы, исходя из их физико-химических свойств; так появились группы миксовирусов [2], поксвирусов [10] и герпесвирусов [1]. В это же время было открыто огромное множество новых вирусов человека и животных. Это побудило некоторых исследователей и классификационные комиссии к созданию различных классификационных схем, часто оказывавшихся взаимоисключающими.

¹ *Frederick A. Murphy*, Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333.

Чтобы исправить положение, в 1966 г. на международном микробиологическом конгрессе в Москве был учрежден Международный комитет по номенклатуре вирусов (МКНВ)¹. К тому времени у вирусологов уже появилась уверенность в возможности создания в ближайшее время единой универсальной таксономической схемы вирусов. Практически никто не сомневался, что сотни разных вирусов, выделенных от людей и животных (а также от растений, насекомых и бактерий), следует классифицировать как единую группу организмов, отдельно от всех остальных биологических объектов; споры вызывал лишь выбор конкретной иерархической схемы. Львов и др. [13] считали, что «система классификации вирусов, как и всякая другая система, должна предполагать иерархию признаков, а иерархия предполагает выбор (в отношении порядка критериев и их значимости)». Даже с той оговоркой, что при этом не учитываются никакие филогенетические взаимоотношения, эта система должна была поместить все вирусы в единое «царство» и создать нисходящую иерархию групп по типу нуклеиновой кислоты, стратегии репликации, симметрии капсида, присутствию или отсутствию наружной мембраны и иным структурным особенностям вириона. Этот иерархический подход не нашел поддержки в МКНВ, и тем не менее схема Львова — Хорна — Турнье стала основой универсальной системы, создание которой началось с работы Уайлди [30]. В этой системе при создании таксонов рассматривается максимально возможное число признаков вирионов, которые упорядочивают по их таксономическому значению. Относительный порядок и «вес» каждого признака фактически устанавливаются условно и зависят от суждений, «в которые нам хотелось бы верить, но которые мы не можем доказать» [8]. Система не содержит иерархических уровней выше, чем семейства, и не предполагает филогенетических взаимоотношений помимо тех, которые установлены экспериментально (например, при помощи гибридизации нуклеиновых кислот, определения нуклеотидных последовательностей, исследования перегруппировки генов и экспериментов по рекомбинации). Система находит широкое применение и вытеснила все другие схемы. Она весьма полезна как для студентов, так и для преподавателей, и привносит строгость в научную литературу по вирусологии [9, 14, 15, 30].

Универсальная система таксономии вирусов МКТВ

Современная универсальная система основана на условно выбранных иерархических уровнях, соответствующих семейству,

¹ В 1973 г. он был переименован в Международный комитет по таксономии вирусов (МКТВ).

роду и виду. Более низкие иерархические уровни, такие как подвид, штамм, вариант и т. д., устанавливаются международными специализированными группами и коллекциями культур.

Семейства вирусов

Семейства вирусов обозначают словами, оканчивающимися на *-viridae*. Несмотря на условность исходных критериев создания семейств, этот уровень иерархии таксонов представляется хорошо обоснованным и устойчивым. Семейства состоят из групп родов вирусов с очевидным общим эволюционным происхождением; например, кажется маловероятным, что множество сходных особенностей структуры и репликации поксвирусов может быть обязано чему-либо иному, кроме общего предшественника. В тех случаях, когда новые данные противоречат этому представлению об общем происхождении вирусов, помещаемых в одно семейство, последнее, вероятно, следует разделить на несколько новых семейств.

Роды вирусов

Названия родов вирусов оканчиваются на *-virus*. Этот уровень иерархии таксонов также хорошо обоснован и полезен, а общность эволюционного происхождения в этом случае еще более очевидна. Критерии, используемые для выделения родов, несколько различаются в разных семействах, и по мере увеличения числа известных вирусов приходится прибегать к более тонким физико-химическим и серологическим различиям для выделения новых родов во многих семействах.

Виды вирусов

Виды вирусов пока не определены формально (за исключением семейства *Adenoviridae*; см. ниже), хотя ясно, что этот уровень иерархии таксонов должен быть эквивалентен современному обиходному значению слова «вирус». Например, выражения «вирус Синдбис, вирус свинки и полиовирус типа 1» полностью соответствуют смыслу слова «вирус» и должны считаться видовыми названиями. Проблема состоит в таком определении термина «вид», которое можно было бы применять однозначно и конструктивно во всех семействах вирусов. Кроме того, неясно, что лучше использовать для обозначения видов: название или код [16]. Эти проблемы должны решиться в ближайшие несколько лет, а пока МКТВ приводит список видов под заголовком «Английское тривиальное название» и оставляет незаполненной графу «Международное название» [15].

Определение видов в семействе Adenoviridae

Определение видов в семействе Adenoviridae было предварительно принято МКТВ в 1981 г. [15, 29]; этим было положено начало введению аналогичных определений в других семействах, в которых вирусы обозначены с помощью алфавитно-цифрового кода. Задача определения вида в семействах, в которых вирусы названы собственными именами, более сложна, и пока принимались лишь неформальные попытки такого рода [19]. Ранее семейство Adenoviridae подразделяли на два рода, *Mastadenovirus* и *Aviadenovirus*, включающие соответственно аденовирусы млекопитающих и птиц. Вирусы человека, входящие в род *Mastadenovirus*, ранее разделяли на пять подродов (подгрупп), от А до Е, на основе гомологии ДНК, ее нуклеотидного состава, способности вызывать опухоли у хомячков, способности к трансформации клеток, гомологии участка генома, ответственного за трансформацию, группы Т- и НА-антигенов. В настоящее время термин «вид» для всех аденовирусов определяют на основе иммунологических особенностей, выявляемых по количественной нейтрализации антисыворотками животных. Данный вид либо не дает перекрестной реакции с другими видами, либо дает отношение титров между гомологичной и гетерологичной реакциями не менее 16 в каждом направлении. В том случае, когда вирус обнаруживает некоторую перекрестную реакцию в одном или обоих направлениях (отношение титров в гомологичной и гетерологичной реакциях равно 8 или 16), самостоятельность вида принимается, если а) гемагглютинины неродственны, что выявляется по отсутствию перекрестной реакции торможения гемагглютинации, или б) имеются существенные биохимические или биофизические различия между ДНК [29]. Кроме того, МКТВ одобрил систему наименования определенных таким образом видов. Она включает использование трехбуквенных кодов (за исключением однобуквенного кода *h* для обозначения вирусов человека), указывающих род хозяина, и порядковый номер в пределах каждой из групп по хозяину (табл. 2.1).

Однозначная идентификация вирусов

Однозначная идентификация вирусов является одной из основных прагматических целей универсальной таксономической системы. Несмотря на неполноту этой системы, в скором времени редакторы журналов (и другие лица, связанные по роду своей деятельности с идентификацией вирусов) будут требовать, чтобы для каждого из использованных в работе вирусов была указана принадлежность к соответствующему семейству, роду

Таблица 2.1. Роды и виды семейства Adenoviridae

Хозяин		Вирус	
Русское название	Латинское название	Род ¹	Вид ²
Человек	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mastadenovirus</i>	От <i>h 1</i> до <i>h 42</i>
Крупный рогатый скот	<i>Bos taurus</i>		От <i>bos 1</i> до <i>bos 9</i>
Свинья	<i>Sus domesticus</i>		От <i>sus 1</i> до <i>sus 4</i>
Овца	<i>Ovis aries</i>		От <i>ovi 1</i> до <i>ovi 5</i>
Лошадь	<i>Equus caballus</i>		<i>equ 1</i>
Собака	<i>Canis familiaris</i>		<i>can 1</i>
Коза	<i>Capra hircus</i>		<i>cap 1</i>
Мышь	<i>Mus musculus</i>		<i>mus 1</i>
Курица	<i>Gallus domesticus</i>	<i>Aviadenovirus</i>	От <i>gal 1</i> до <i>gal 9</i>
Индейка	<i>Meleagris gallopavo</i>		От <i>mel 1</i> до <i>mel 2</i>
Гусь	<i>Anser domesticus</i>		<i>ans 1</i>
Фазан	<i>Phasianus colchicus</i>		<i>pha 1</i>
Утка	<i>Anas domestica</i>		<i>ana 1</i>

¹ У вирусов человека определены также подроды [29].² Из-за сложностей классификации хозяев видовые названия аденовирусов, выделенных от обезьян и других низших приматов, не установлены.

и виду, а также даны и более подробные обозначения, разработанные специализированными группами (например, Picornaviridae, *Enterovirus polio 1*, штамм: Брюнхильд ATCC VR 58) [16]. Ключевым указателем к номенклатуре вирусов является последний отчет Международного комитета по таксономии вирусов — «Классификация и номенклатура вирусов» [15] и сообщения специализированных групп и коллекций культур.

Характеристики вирусов

Характеристики вирусов, используемые для создания таксонов, бывают самыми разнообразными — простыми и сложными, рациональными и историческими. В первую очередь должны учитываться те из них, которые связаны с составом нуклеиновых кислот и белков, а также типом репликации, однако на самом деле сейчас классификация основывается в значительной мере на других свойствах вирусов, которые легче определить. Например, методология характеристики нуклеиновых кислот (определение нуклеотидного состава, олигонуклеотидное картирование, картирование с помощью ферментов рестрикции, гибридизация, определение повторяющихся и инвертированных последовательностей, гетеродуплексное картирование, определение последовательности оснований и т. д.) пока не находит широкого

применения для характеристики вирусов. Использование подобных критериев в таксономических целях не привело к заметному успеху (примером может служить семейство *Herpesviridae*). Сейчас наиболее широко используются характеристики, выявленные при электронно-микроскопических исследованиях вирионов и зараженных клеток (морфология, структура и размер вирионов, тип морфогенеза и его локализация, наличие или отсутствие внешней оболочки и т. д.). Таким образом, в большинстве случаев вирусы можно поместить в соответствующее семейство и род по визуальным признакам и результатам электронно-микроскопических исследований с использованием негативного контрастирования и/или получения тонких срезов [18]. Поскольку морфология вириона является ценным интегральным признаком, на рис. 1—20 показаны представители каждого из 20 семейств (и нескольких морфологически отличных родов), включающих вирусы человека и животных. В дополнение к электронной микроскопии при классификации обычно используют серологические методы и определение устойчивости к различным факторам (изменению pH, температуры, действию растворителей жиров и т. д.). Эти методические приемы доступны для большинства лабораторий во всем мире. Подобная идентификация и таксономическая характеристика представляют собой скорее повторение исторических этапов открытия вируса, нежели рациональную последовательную процедуру идентификации. Классическая схема идентификации хороша тем, что после создания таксона с использованием большого числа признаков обычно требуется немного дополнительных данных для того, чтобы поместить новый вирус в соответствующий таксон. Исключение составляют случаи, когда вирус не укладывается в соответствующие критерии и встает вопрос о создании нового семейства или нового рода. В этом случае прибегают к более полной характеристике, включая определение нуклеотидного и аминокислотного состава, а также изучение стратегии репликации.

Семейства, включающие вирусы человека и животных

Из более чем 55 семейств, признанных МКТВ, 17 включают вирусы человека и животных [15]. Кроме того, предложены еще три семейства, пока не принятые официально. Нерешенной проблемой остается порядок семейств вирусов; это опять указывает на произвольность значения, приписываемого тем или иным характеристикам вириона при таксономии [16]. Список семейств, включающих вирусы человека и животных, приведен в табл. 2.2 в порядке, принятом МКТВ [15]. Порядок определяется типом нуклеиновой кислоты, наличием или отсутствием внешней оболочки, механизмом репликации, позитивностью или негативностью генома, а также его сегментацией.

Таблица 2.2. Семейства, включающие вирусы человека и животных

Определяющее свойство	Семейство
Двухцепочечная ДНК, имеется внешняя оболочка	Poxviridae Iridoviridae Herpesviridae
Двухцепочечная ДНК, внешняя оболочка отсутствует	Adenoviridae Papovaviridae [Hepadnaviridae] ¹ Parvoviridae
Одноцепочечная ДНК, внешняя оболочка отсутствует	Reoviridae [Birnaviridae] ¹
Двухцепочечная РНК, без внешней оболочки	
Одноцепочечная РНК, имеется внешняя оболочка	
ДНК-копии в репликативном цикле отсутствуют	
Позитивный геном	Togaviridae Coronaviridae
Негативный геном	
Несегментированный геном	Paramyxoviridae Rhabdoviridae [Filoviridae] ¹
Сегментированный геном	Orthomyxoviridae Bunyaviridae Arenaviridae Retroviridae Picornaviridae Caliciviridae
ДНК-копии участвуют в репликативном цикле	
Одноцепочечная РНК, внешняя оболочка отсутствует	

¹ В этой главе квадратные скобки применяются для названий, которые еще не утверждены МКТВ. Станут ли эти названия официальными — неизвестно. Используемые термины: внешняя оболочка — липидсодержащий бислой, происходящий частично из клеточной мембраны; позитивный геном — это геном, состоящий из нуклеотидных последовательностей, которые могут непосредственно транслироваться в белок; в случае ДНК-содержащих вирусов он имеет такую же последовательность, что и соответствующая мРНК; негативный геном — это геном, состоящий из нуклеотидных последовательностей, комплементарных мРНК.

Таксономическое описание семейств, включающих вирусы человека и животных

Семейство: Poxviridae [15] (поксвирусы) (рис. 2.1)¹

Подсемейство: Chordopoxvirinae (поксвирусы позвоночных).

Род: Orthopoxvirus (вирусы осповакцины, оспы).

Род: Parapoxvirus [вирус инфекционного пустулезного дерматита (вирус орфа)].

Род: Avipoxvirus (вирус оспы кур).

¹ Микрофотографии, приведенные в этой главе, любезно предоставили E. L. Palmer, M. L. Martin, A. K. Harrison, S. G. Whitfield, L. D. Pearson, T. Baker, E. H. Cook, C.-H. von Bonsdorff, J. Esposito, C. Smale, M. V. Nermut, C. Mebus и V. I. Heine.

Род: *Capripoxvirus* (вирус оспы овец).

Род: *Leporipoxvirus* (вирус миксомы).

Род: *Suipoxvirus* (вирус оспы свиней).

Подсемейство: Entomopoxvirinae (поксвирусы насекомых; возможно, три рода).

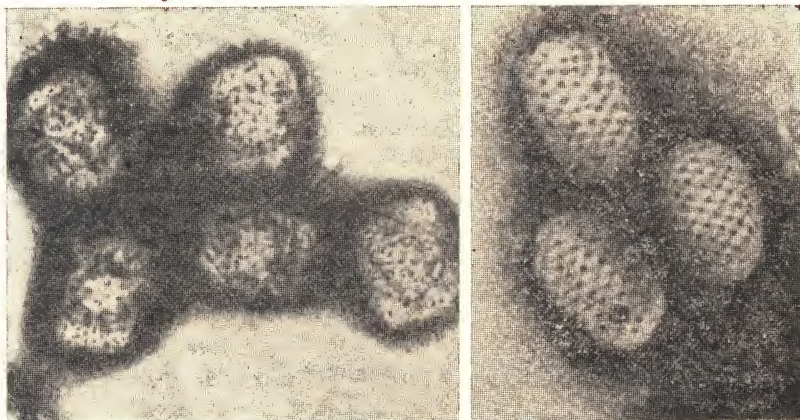


Рис. 2.1. Poxviridae: *Orthopoxvirus*, вирус осповакцины (слева), и *Parapoxvirus*, вирус инфекционного пустулезного дерматита (орфа) (справа); $\times 49\,500$.

Свойства

Вирионы поксвирусов крупные, имеют форму параллелепипеда (или яйцевидную, как в случае рода *Parapoxvirus*). Их размер — $(300\text{—}450) \times (170\text{—}260)$ нм. У них имеется внешняя оболочка и лежащее под ней сложное образование из тубулярных структур, а также внутреннее ядро, состоящее из ДНК-содержащей сердцевины и одного или двух боковых телец. Геном представляет собой одну молекулу двухцепочечной ДНК с мол. массой $(85\text{—}250) \cdot 10^6$. Вирусы имеют более 30 структурных белков и несколько ферментов (включая ДНК-зависимую транскриптазу). Репликация и сборка происходят в цитоплазме на «вирусных фабриках» (тельцах-включениях), а образующиеся вирионы выходят из клетки при помощи почкования (вирусы с внешней оболочкой) или в результате разрушения клетки (вирусы без внешней оболочки). У поксвирусов имеется общий группоспецифичный нуклеопротеиновый антиген, а вирусы рода *Orthopoxvirus* синтезируют невирионный гемагглютинин.

Возбудители заболеваний человека

Orthopoxvirus: вирусы оспы, осповакцины, обезьяньей оспы, коровьей оспы. *Parapoxvirus*: вирус орфа (инфекционного пу-

стулезного дерматита), вирус псевдооспы коров (узелков доильщиц). Неклассифицированные поксвирусы: вирус контагиозного моллюска, вирус Яба, вирус Тана.

Возбудители заболеваний животных

Orthopoxvirus: вирус коровьей оспы, эктромелии (мышинной оспы), вирус оспы кроликов, вирус оспы обезьян. *Parapoxvirus*: вирус орфа (инфекционного пустулезного дерматита), вирус псевдооспы коров (узелков доильщиц), вирус бычьего папулёзного стоматита. *Avipoxvirus*: многочисленные виды поксвирусов птиц. *Capripoxvirus*: вирус оспы овец, вирус оспы коз, вирус кожной болезни коров. *Leporipoxvirus*: вирус миксомы (кроликов), вирус фибромы кроликов, вирус фибромы зайцев, вирус фибромы белок. *Suipoxvirus*: вирус оспы свиней. Неклассифицированные поксвирусы: вирус Тана, вирус Яба (обезьян).

Семейство: Iridoviridae [15] (иридовирусы) (рис. 2.2)

Под: Iridovirus (мелкие иридисцентные вирусы насекомых).

Под: Chloriridovirus (крупные иридисцентные вирусы насекомых).

Под: Ranavirus (вирусы лягушек).

Под: (без названия) (вирус лимфокистоза рыб).

Под: (без названия) (вирус африканской чумы свиней).

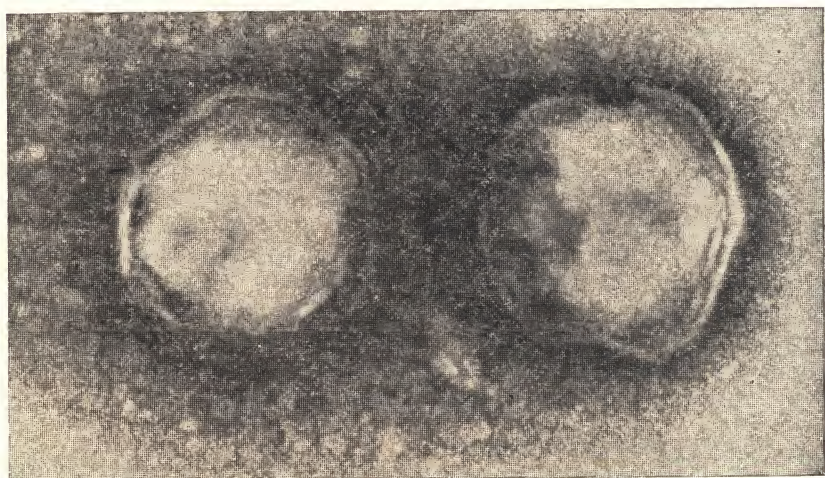


Рис. 2.2. Iridoviridae: вирус африканской чумы свиней; $\times 105\,000$.

Свойства

Вирионы иридовирусов имеют липидсодержащую внешнюю оболочку (отсутствующую у некоторых вирусов насекомых) и икосаэдрический нуклеокапсид. Диаметр вириона 125—300 нм. Геном представляет собой одну молекулу двухцепочечной ДНК с мол. массой $(100—250) \cdot 10^6$. Вирусы имеют более 20 структурных белков, в том числе несколько вирионных ферментов. Репликация происходит в цитоплазме (хотя ядро и необходимо для синтеза ДНК), а вирионы освобождаются в результате почкования или при разрушении клетки. Антитела против вируса африканской чумы свиней не нейтрализуют вирус, но связываются с ним.

Возбудители заболеваний человека

Не обнаружены.

Возбудители заболеваний животных

Вирус африканской чумы свиней и несколько вирусов лягушек.

Семейство: Herpesviridae [24] (вирусы герпеса) (рис. 2.3)

Подсемейство: Alphaherpesvirinae (вирусы, подобные вирусу простого герпеса).

Род: [Simplexvirus]¹ (вирусы, подобные вирусу простого герпеса).

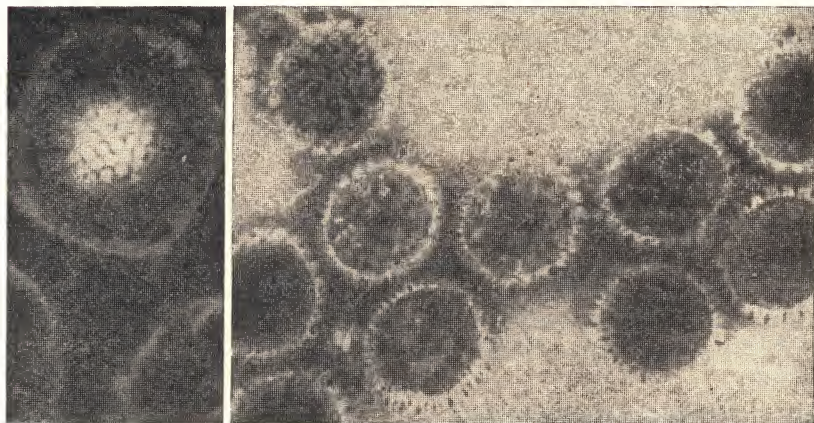


Рис. 2.3. Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: [Simplexvirus], вирус простого герпеса типа 1, имеющий внешнюю оболочку (слева) и лишенный ее (голые капсиды) (справа); $\times 189\,000$.

¹ В скобки заключены названия, не утвержденные МКТВ [24].

Род: [Poikilovirus] (вирус псевдобешенства и подобные ему).

Род: [Varicellavirus] (вирус ветряной оспы/опоясывающего лишая).

Подсемейство: Betaherpesvirinae (цитомегаловирусы).

Род: [Cytomegalovirus] (цитомегаловирусы человека).

Род: [Muromegalovirus] (цитомегаловирусы мышей).

Подсемейство: Gammaherpesvirinae (вирусы, связанные с лимфоцитами).

Род: [Lymphocryptovirus] [вирусы, подобные вирусу Эпштейна — Барр (ЭР)].

Род: [Thetalymphocryptovirus] (вирусы, подобные вирусу болезни Марека).

Род: [Rhadinovirus] (вирусы, подобные вирусу обезьян саймири и ателес).

Свойства

Вирионы герпесвирусов имеют а) внешнюю оболочку с поверхностными выступами; б) наружный слой, состоящий из аморфного материала; в) икосаэдрический капсид и г) сердцевину, состоящую из фибриллярной «катушки», на которую намотан ДНК. Общий размер вирусной частицы — от 100 до 200 нм. Геном представляет собой одну молекулу двухцепочечной ДНК с мол. массой $(80—150) \cdot 10^6$. Вирусы имеют более 20 структурных белков, включающих иногда рецептор для F_c во внешней оболочке. Репликация происходит в ядре; капсиды получают внешнюю оболочку при почковании от внутреннего слоя ядерной мембраны. Вирусные частицы транспортируются через цитоплазму в мембранных везикулах, которые затем сливаются с плазматической мембраной. Некоторые герпесвирусы вызывают неоплазию, и многие из них персистируют в течение всей жизни их природных хозяев.

Возбудители заболеваний человека

[Simplexvirus]: вирусы простого герпеса (HSV) типов 1 и 2, В-вирус. *[Varicellavirus]*: вирус ветряной оспы/опоясывающего лишая (VZV). *[Cytomegalovirus]*: цитомегаловирус человека. *[Lymphocryptovirus]*: вирус Эпштейна — Барр.

Возбудители заболеваний животных

[Simplexvirus]: вирус маммилита крупного рогатого скота, В-вирус. *[Poikilovirus]*: вирус псевдобешенства (свиней), вирус ринопневмонии лошадей. *[Muromegalovirus]*: мышинный цитомегаловирус. *[Lymphocryptovirus]*: герпесвирус павианов, герпесви-

рус шимпанзе. [*Thetalymphocryptovirus*]: герпесвирус болезни Марека (кур), герпесвирус индеек. [*Rhadinovirus*]: герпесвирус обезьян ателес, герпесвирус обезьян саймири. Существуют сотни других герпесвирусов, связанных с заболеваниями животных; большинство их пока не распределено по подсемействам и родам.

Семейство: Adenoviridae [20, 29] (аденовирусы) (рис. 2.4)

Род: Mastadenovirus (аденовирусы млекопитающих).

Подрод¹: A.

Виды: h12, h18, h31².

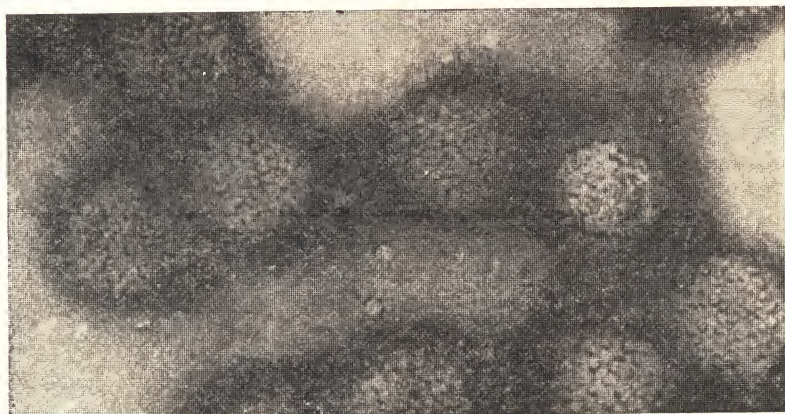


Рис. 2.4. Adenoviridae: *Mastadenovirus h5*, аденовирус человека, тип 5; $\times 234\,000$.

Подрод: B.

Виды: h3, h7, h11, h14, h16, h21, h34, h35.

Подрод: C.

Виды: h1, h2, h5, h6.

Подрод: D.

Виды: h8, h9, h10, h13, h15, h17, h19, h22, h23, h24, h26, h27, h29, h30, h32, h33, h36, h37.

Подрод: E.

Вид: h4.

(Подроды не определены.)

¹ Подроды были установлены только для аденовирусов человека [29].

² Аденовирусы человека обозначают буквой *h* и цифровым кодом; вирусы животных и птиц обозначают трехбуквенным кодом, указывающим род хозяина, и цифровым кодом. Эти алфавитно-цифровые кодовые обозначения являются первым примером официально признанных обозначений вида вируса.

Виды: от *bos1* до *bos9* (аденовирусы крупного рогатого скота) ¹,
от *sus1* до *sus4* (аденовирусы свиней),
от *ovi1* до *ovi5* (аденовирусы овец),
equ1 (аденовирус лошадей),
от *can1* до *can2* (аденовирусы собак)
cap1 (козлий аденовирус),
mus1 (аденовирус мышей).

Род: *Aviadenovirus* (аденовирусы птиц).

Виды: от *gal1* до *gal9* (аденовирусы кур),
от *mel1* до *mel2* (аденовирусы индеек),
ans1 (аденовирус гусей),
pha1 (аденовирус фазанов),
ana1 (аденовирус уток).

Свойства

Вирионы аденовирусов лишены внешней оболочки и имеют икосаэдрическую симметрию. Диаметр частицы составляет от 70 до 90 нм. Она состоит из 252 капсомеров, причем 12 из них, расположенных в вершинах (основания пентонов), имеют продолговатые выросты, которые несут главные видоспецифические и минорные подродоспецифические эпитопы, а остальные 240 капсомеров (гексонов) несут главные родоспецифические, подродоспецифические и минорные видоспецифические эпитопы. Геном представляет собой одну молекулу двухцепочечной ДНК с мол. массой (20—25) · 10⁶. Вирусы имеют по крайней мере 10 структурных белков. Репликация и сборка осуществляются в ядре (синтез полипептидных цепей происходит в цитоплазме), а вирионы освобождаются в результате разрушения клетки. Круг хозяев у большинства видов весьма узок. Некоторые аденовирусы вызывают опухоли у новорожденных гетерологичных видов животных.

Возбудители заболеваний человека

Mastadenovirus: от *h1* до *h37* (аденовирусы человека).

Возбудители заболеваний животных

Mastadenovirus: *equ1* (аденовирус лошадей), *can1* (вирус инфекционного гепатита собак), *can2* (аденовирус собак). Многие другие аденовирусы млекопитающих и птиц.

Семейство: Papovaviridae [17] (паповавирусы) (рис. 2.5)

Род: *Papillomavirus* (вирусы папилломы).

Род: *Polyomavirus* (вирусы полиомы).

¹ См. сноску ² на стр. 31.

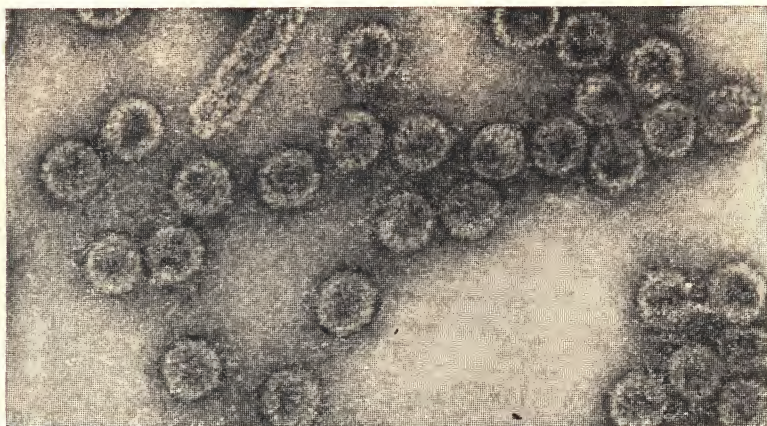


Рис. 2.5. Papovaviridae: *Papillomavirus*, вирус бородавок человека; $\times 135\,000$.

Свойства

Вирионы паповавирусов лишены внешней оболочки. Они имеют икосаэдрическую симметрию, а диаметр их составляет от 45 до 55 нм. Вирусные частицы состоят из 72 капсомеров, образующих поверхностную решетку с $T=7$. Геном представляет собой одну кольцевую молекулу двухцепочечной ДНК с мол. массой $(3-5) \cdot 10^6$. Вирусы имеют от пяти до семи структурных белков. Репликация и сборка происходят в ядре, а вирионы высвобождаются при разрушении клеток. Круг хозяев большинства вирусов весьма узок. Для некоторых паповавирусов характерна способность к трансформации клетки-хозяина и онкогенезу.

Возбудители заболеваний человека

Papillomavirus: по крайней мере девять вирусов папилломы человека (вирусы бородавок). *Polyomavirus*: хотя вирусы ВК и JC, включаемые в этот род, выделены от человека, их связь с неоплазиями у человека не доказана.

Возбудители заболеваний животных

Papillomavirus: вирус папилломы Шоупа (кроликов) и вирусы папилломы многих других видов животных. *Polyomavirus*: SV40 (выделен от макака-резуса) и некоторые другие полиома-вирусы животных.

Предполагаемое семейство: [Hepadnaviridae] [23]
(вирусы, подобные вирусу гепатита В) (рис. 2.6)

(Роды не определены.)

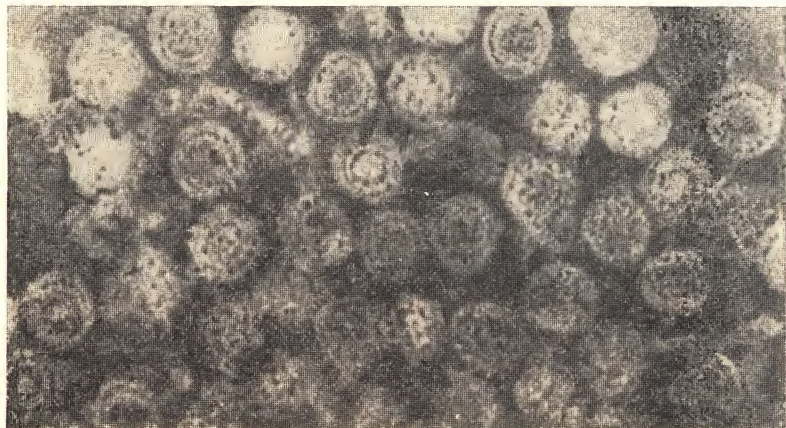


Рис. 2.6. [Hepadnaviridae]: вирус гепатита В; $\times 225\,000$.

Свойства

Вирионы вируса гепатита В и сходных вирусов имеют внешнюю оболочку (содержащую липиды и HBsAg), которая окружает нуклеокапсид (содержащий HBcAg). Диаметр вириона составляет 42 нм (частицы Дейна), а нуклеокапсида — 18 нм. Геном представляет собой одну кольцевую молекулу ДНК с мол. массой $1,6 \cdot 10^6$; в ней имеются один разрыв и одноцепочечный участок. Вирусы содержат два главных полипептида, составляющие HBsAg, одну полипептидную цепь, составляющую HBcAg, и другие полипептиды (HBeAg). Репликация осуществляется в ядрах гепатоцитов (с накоплением HBcAg), а HBsAg образуется в цитоплазме в значительных количествах; этот процесс сопровождается экзоцитозом, приводящим к антигенемии.

Возбудители заболеваний человека

Вирус гепатита В.

Возбудители заболеваний животных

Вирусы, подобные вирусу гепатита В, вызывающие заболевание у сурков, земляной белки, красной белки (*Callosciurus erythracus*) и пекинских уток.

Семейство: Parvoviridae [3] (парвовирусы) (рис. 2.7)

Под: Parvovirus (парвовирусы млекопитающих и птиц).

Под: Dependovirus (аденоассоциированные вирусы, AAV).

Под: Densovirus (парвовирусы насекомых).

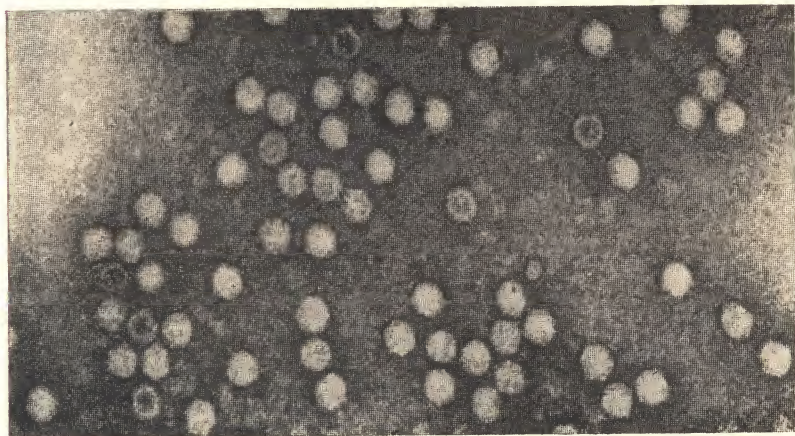


Рис. 2.7. Parvoviridae: *Parvovirus*, вирус H-1; $\times 171\,000$.

Свойства

Вирионы парвовирусов лишены внешней оболочки, обладают икосаэдрической симметрией и имеют диаметр 18—26 нм. Вирусные частицы состоят из 32 капсомеров, образующих поверхностную решетку с $T=3$. Геном представлен одной молекулой одноцепочечной ДНК с мол. массой $(1,5-2,0) \cdot 10^6$. Вирусы содержат три главных полипептида. Репликация и сборка происходят в ядре при содействии хозяйской клетки, реализующемся в период от поздней фазы S до ранней фазы G2 клеточного цикла. Вирионы очень стабильны к изменениям pH и нагреванию. Вирусы имеют узкий круг хозяев.

Возбудители заболеваний человека

Возможно, вирус Норуок и родственные ему (морфологически сходные) вирусы (вирус гастроэнтерита).

Возбудители заболеваний животных

Parvovirus: вирус панлейкопении кошек, парвовирус собак, вирус энтерита норок, вирус алеутской болезни норок, бычий

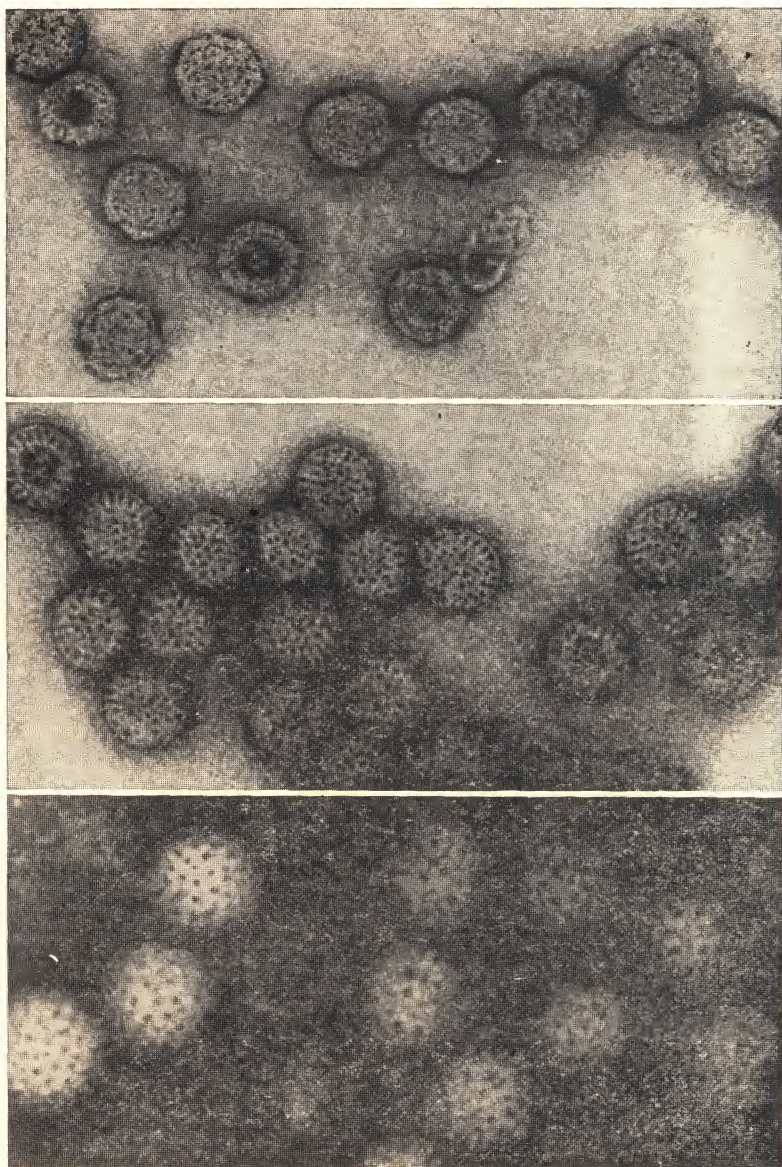


Рис. 2.8. Reoviridae: *Reovirus*, реовирус типа 2 (вверху); *Rotavirus*, ротавирус человека (в середине); *Orbivirus*, вирус синего языка типа 11 (внизу); $\times 135\,000$ (вверху и в середине); $\times 243\,000$ (внизу).

парвовирус, парвовирус гусей, парвовирус свиней, вирус Н-1 и другие парвовирусы мышей.

Семейство: Reoviridae [15] (реовирусы) (рис. 2.8)

Под: Reovirus (реовирусы человека и животных).

Под: Orbivirus (орбивирусы).

Под: Rotavirus (ротавирусы).

Под: Phytoreovirus (подгруппа 1 реовирусов растений).

Под: Fijivirus (подгруппа 2 реовирусов растений).

Под: Cyrovirus (вирус цитоплазматического полиэдроза).

Свойства

Вирусы указанных родов различаются по морфологическим и физико-химическим особенностям. Обычно вирусные частицы лишены внешней оболочки, содержат две капсидные оболочки (каждая с икосаэдрической симметрией) и имеют диаметр от 60 до 80 нм. Геном состоит из 10—12 сегментов линейной двухцепочечной РНК с общей мол. массой $(12-20) \cdot 10^6$. Вирусы содержат от 6 до 10 вирионных полипептидов, включая транскриптазу и другие ферменты. Репликация и сборка происходят в цитоплазме, часто в связи с гранулярной или фибриллярной вироплазмой. Рота- и реовирусы передаются прямым путем; орбивирусы переносятся членистоногими.

Возбудители заболеваний человека

Reovirus: реовирусы типов 1, 2 и 3 выделены от человека, но их этиологическая связь с заболеваниями (диарея, лихорадочные заболевания) не доказана. *Orbivirus*: вирус колорадской клещевой лихорадки¹, вирус Орунго (лихорадочное заболевание в Нигерии и Уганде), вирус Кемерово (лихорадочное заболевание в СССР и Египте). *Rotavirus*: ротавирусы человека.

Возбудители заболеваний животных

Reovirus: реовирусы типов 1, 2 и 3 являются возбудителями заболеваний мышей и других животных. *Orbivirus*: вирус синего языка, вирус африканской чумы лошадей, вирус эпизоотической геморрагической болезни оленей и другие вирусы, поражающие различные виды животных. *Rotavirus*: ротавирусы являются важнейшей причиной диареи у большинства видов.

¹ Поскольку двухцепочечная РНК вируса колорадской клещевой лихорадки состоит не из 10 сегментов, как у всех представителей рода *Orbivirus*, а из 12, его следует поместить в отдельный род.

Предполагаемое семейство: [Birnaviridae]
[15] (вирусы с двухцепочечной РНК,
состоящей из двух сегментов) (рис. 2.9)

(Роды не установлены.)

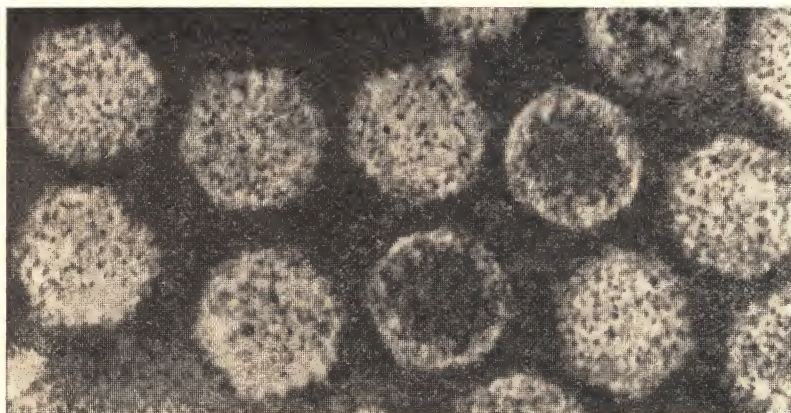


Рис. 2.9. [Birnaviridae]: вирус инфекционной болезни бурсы; $\times 243\,000$.

Свойства

Вирионы бирнавирусов лишены внешней оболочки, имеют икосаэдрическую симметрию и диаметр 60 нм. Вирионы содержат 92 капсомера, образующие поверхностную решетку с $T=9$. Геном состоит из двух сегментов линейной двухцепочечной РНК с суммарной мол. массой $4,8 \cdot 10^6$. Вирусы содержат четыре главных вирионных полипептида, включая транскриптазу. Репликация и сборка происходят в цитоплазме, а высвобождение вирусных частиц осуществляется при разрушении клетки.

Возбудители заболеваний человека

Не обнаружены.

Возбудители заболеваний животных

Вирус инфекционной болезни бурсы кур, вирус инфекционного некроза поджелудочной железы рыб.

Семейство: *Togaviridae* [22] (тогавирусы) (рис. 2.10)

Род: Alphavirus (арбовирусы «группы А»).

Род: Flavivirus (арбовирусы «группы В»).

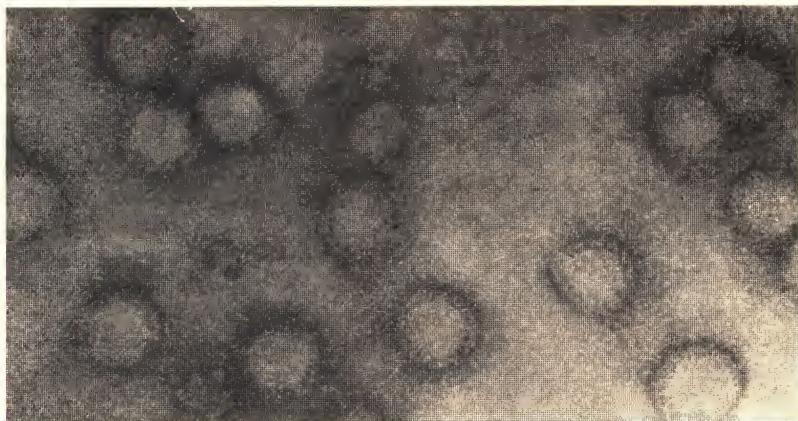


Рис. 2.10. *Togaviridae: Rubivirus*, вирус краснухи; $\times 135\,000$.

Под: Rubivirus (вирус краснухи).

Под: Pestivirus (вирусы болезни слизистых оболочек).

Свойства

Вирион имеет внешнюю липидсодержащую оболочку с поверхностными выступами, окружающую нуклеокапсид (по-видимому, с икосаэдрической симметрией). Диаметр вириона от 40 до 70 нм. Геном состоит из одной молекулы позитивной инфекционной одноцепочечной РНК с мол. массой $4 \cdot 10^6$. Частицы содержат от трех до четырех главных вирусных полипептидов, причем один или два из них гликозилированы. Большинство вирусов обнаруживает рН-зависимую гемагглютинирующую активность. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка включает этап отпочковывания от мембраны хозяйской клетки. Все альфа-вирусы, большинство флавивирусов, но не рубивирусы и пестивирусы способны размножаться как в членистоногих, так и в позвоночных.

Возбудители заболеваний человека

Alphavirus: вирус восточного энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей, вирус венесуэльского энцефалита лошадей, вирус Чикунгунья, вирус О'Ньонг-Ньонг, вирус Росс-Ривер, вирус Майаро. *Flavivirus*: вирус желтой лихорадки, вирус денге, вирус Западного Нила, вирус энцефалита Сан-Луи, вирус Росио, вирус японского энцефалита, вирус энцефалита долины Мюррей, вирус клещевого энцефалита и другие флавивирусы. *Rubivirus*: вирус краснухи.

Возбудители заболеваний животных

Alphavirus: вирус восточного энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей, вирус венесуэльского энцефалита лошадей. *Flavivirus*: вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита, вирус клещевого энцефалита и вирус Вессельсброн. *Pestivirus*: вирус болезни слизистых оболочек (вирус крупного рогатого скота, вирус диареи), вирус холеры свиней, вирус пограничной (border) болезни овец. Неклассифицированные тогавирусы: вирус артериита лошадей, лактатдегидрогеназный вирус мышей, вирус геморрагической лихорадки обезьян.

Семейство: Coronaviridae [26] (коронавирусы) (рис. 2.11)

Под: Coronavirus (коронавирусы человека, других млекопитающих и птиц).

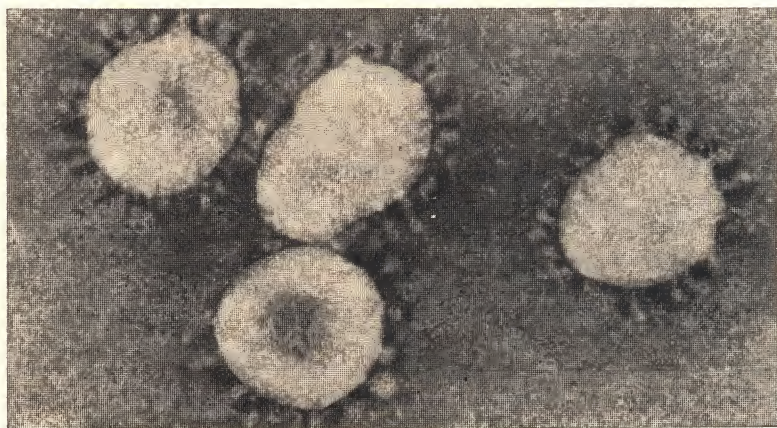


Рис. 2.11. Coronaviridae: *Coronavirus*, коронавирус человека OC43; $\times 180\,000$.

Свойства

Вирионы коронавирусов имеют плейоморфную липидсодержащую оболочку с большими булавовидными выступами, внутри которой заключена спиральная нуклеокапсидная структура диаметром от 11 до 13 нм. Диаметр вирионов от 75 до 160 нм. Геном состоит из одной молекулы позитивной инфекционной одноцепочечной РНК с мол. массой $(5,5-8,1) \cdot 10^6$. Частицы содержат от четырех до шести главных структурных вирусных полипептидов, два из которых гликозилированы. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка включает этап отпочковывания, обыч-

но от внутрицитоплазматических мембран; освобождение вирусных частиц осуществляется путем слияния мембран и экзоцитоза.

Возбудители заболеваний человека

Коронавирусы человека (возбудители ОРЗ, возможно, пневмонии и гастроэнтерита).

Возбудители заболеваний животных

Вирус инфекционного бронхита птиц, вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней, гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней, вирус синего гребня индеек, коронавирус телят (диарея новорожденных), вирус инфекционного перитонита кошек.

Семейство: Paramyxoviridae [12] (парамиксовирусы) (рис. 2.12)

Под: Paramyxovirus (парамиксовирусы).

Под: Morbillivirus (вирусы, подобные вирусу кори).

Под: Pneumovirus (респираторно-синцитиальные вирусы).

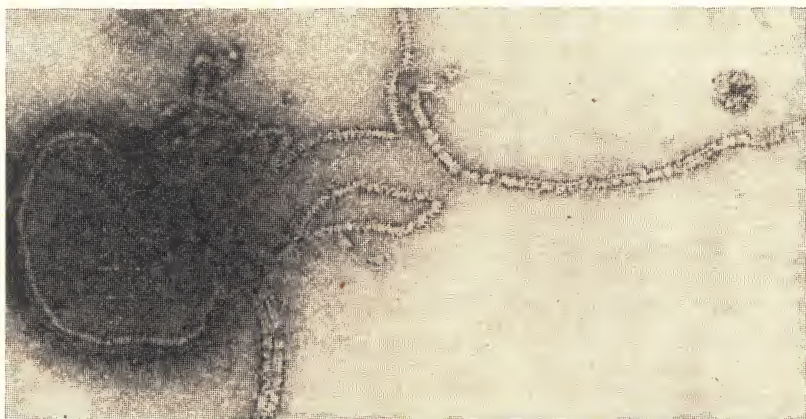


Рис. 2.12. Paramyxoviridae: *Paramyxovirus*, вирус парагриппа человека, тип 1; $\times 72\,000$.

Свойства

Вирионы парамиксовирусов имеют плейоморфную липидсодержащую оболочку с крупными поверхностными выступами, внутри которой заключен спиральный нуклеокапсид диаметром

от 12 до 17 нм. Диаметр вириона от 150 до 300 нм. Геном состоит из одной молекулы негативной одноцепочечной РНК с мол. массой $(5-8) \cdot 10^6$ (некоторые частицы содержат плюс-цепи). Вирусы имеют от пяти до семи главных полипептидов, в том числе транскриптазу и нейраминидазу (за исключением морбилливирусов). Вирусы обнаруживают гемагглютинирующую активность благодаря наличию поверхностного гликопротеина HN и стимулируют слияние клеток с помощью другого гликопротеина (F). Репликация происходит в цитоплазме, а сборка осуществляется путем отпочковывания от плазматической мембраны. Круг хозяев вирусов весьма узок. Морбилливирусы могут вызывать персистентные инфекции.

Возбудители заболеваний человека

Paramyxovirus: вирусы парагриппа типов 1, 2, 3 и 4, вирус свинки. *Morbillivirus*: вирус кори. *Pneumovirus*: респираторно-синцитиальный вирус.

Возбудители заболеваний животных

Paramyxovirus: вирус ньюкаслской болезни, вирус парагриппа типа 1 (вирус Сендай мышей), вирус парагриппа 3 (крупного рогатого скота), другие парамиксовирусы крупного рогатого скота, другие парамиксовирусы птиц. *Morbillivirus*: вирус чумы крупного рогатого скота, вирус чумы плотоядных, вирус, вызывающий заболевание у овец и коз (*peste des petits ruminants*). *Pneumovirus*: бычий респираторно-синцитиальный вирус, вирус пневмонии мышей.

Семейство: Rhabdoviridae [5] (рабдовирусы) (рис. 2.13)

Под: Vesiculovirus (вирусы везикулярного стоматита и сходные с ними).

Под: Lyssavirus (вирус бешенства и сходные с ним).

Под: (без названия) (группа рабдовирусов растений).

Многие другие рабдовирусы млекопитающих, птиц, рыб, членистоногих и т. д., не отнесенные ни к каким группам.

Свойства

Вирионы рабдовирусов имеют пулевидную форму, а у вирусов растений — часто бациллоподобную форму; их диаметр от 50 до 95 нм, длина 130—380 нм. Частицы имеют липидсодержащую внешнюю оболочку с поверхностными выступами, внутри которой заключен спиральный нуклеокапсид, образующий совершен-

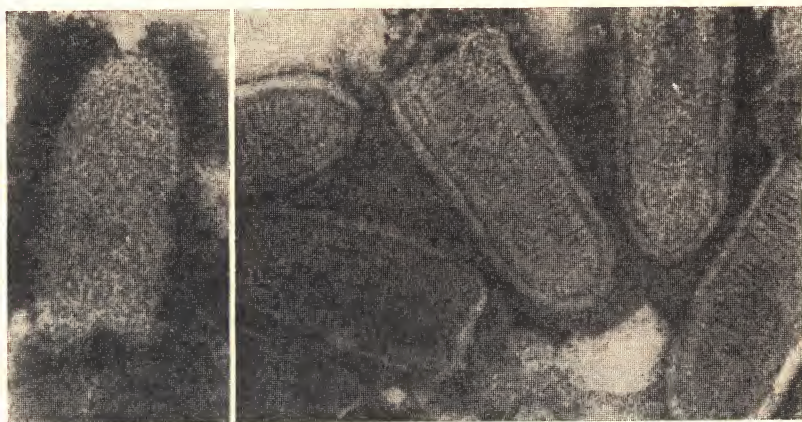


Рис. 2.13. Rhabdoviridae: *Lyssavirus*, вирус бешенства (слева); *Vesiculovirus*, вирус везикулярного стоматита Индиана (справа); $\times 216\ 000$.

ную цилиндрическую структуру. Геном состоит из одной молекулы негативной одноцепочечной РНК с мол. массой $(3,5—4,6) \cdot 10^6$. Вирусы содержат от 4 до 5 главных полипептидов, включая транскриптазу. Они могут проявлять гемагглютинирующую активность благодаря наличию поверхностного гликопротеина. Перекрестные (группоспецифичные) серологические реакции в основном протекают с участием белка нуклеопротеина N. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка осуществляется с помощью отпочковывания от плазматической мембраны (в случае вируса везикулярного стоматита) или внутрицитоплазматических (вирус бешенства) мембран. Многие вирусы реплицируются в организме членистоногих и передаются ими.

Возбудители заболеваний человека

Vesiculovirus: вирусы везикулярного стоматита Индиана, Нью-Джерси и Кокал, вирус Чандипура, вирус Пири, вирус Исфаган. *Lyssavirus*: вирус бешенства, вирус Мокола, вирус Дувенхаге.

Возбудители заболеваний животных

Vesiculovirus: вирусы везикулярного стоматита Индиана, Нью-Джерси, Кокал, Аргентина, Бразилия, вирус Чандипура, вирус Пири, вирус Исфаган. *Lyssavirus*: вирус бешенства, вирус Мокола, вирус Дувенхаге, вирус Лагос (летучих мышей), вирус

Котонкан, вирус Ободхийанг. *Неклассифицированные вирусы*: вирус бычьей кожной лихорадки, вирус Эгтвед и вирус инфекционного некроза кроветворных органов у рыб.

Предполагаемое семейство: [Filoviridae]
[11] (вирусы Марбург и Эбола) (рис. 2.14)

(Роды не установлены.)



Рис. 2.14. [Filoviridae]: вирус Эбола; $\times 59\,500$.

Свойства

Вирионы вирусов Марбург и Эбола имеют вид длинных нитевидных образований, иногда ветвящихся, а иногда U-образных, в форме цифры 6 или кольца. Диаметр вирионов всегда равен 80 нм, а длина сильно варьирует (достигая 14 000 нм). Инфекционная частица единичной длины имеет размер 790 нм (вирус Марбург) или 970 нм (вирус Эбола). Вирионы имеют липидсодержащую внешнюю оболочку с поверхностными выступами, окружающую довольно жесткий спиральный нуклеокапсид. Геном состоит из одной молекулы предположительно негативной одноцепочечной РНК с мол. массой $4,2 \cdot 10^6$. Вирусы имеют пять главных полипептидов. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка включает этап отпочковывания преформированного нуклеокапсиды от клеточной мембраны. Вирусы Марбург и Эбола относятся к категории 4 особоопасных патогенов. С ними можно работать только в лабораториях, оборудованных с соблюдением самых строгих мер техники безопасности.

Возбудители заболеваний человека

Вирусы Марбург и Эбола.

Возбудители заболеваний животных

Вирусы Марбург и Эбола (экспериментальное заражение обезьян, морских свинок, хомяков и мышей).

Семейство: Orthomyxoviridae [7] (вирусы гриппа) (рис. 2.15).

Под: Influenzavirus (вирусы гриппа А и В).

Под: (без названия) (вирус гриппа С).

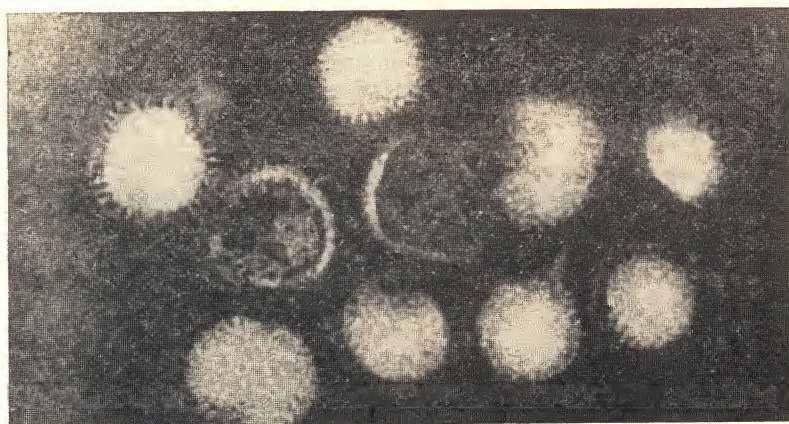


Рис. 2.15. Orthomyxoviridae: *Influenzavirus*, вирус гриппа А; $\times 135\,000$.

Свойства

Вирионы ортомиксовирусов имеют плеоморфные липидсодержащие наружные оболочки с большими поверхностными выступами, окружающие спиральный нуклеокапсид с неизвестным характером укладки и диаметром от 9 до 15 нм. Диаметр вирионов составляет от 80 до 120 нм; частицы могут быть и нитевидными, длиной до нескольких микрон. Геном состоит из восьми молекул линейной негативной одноцепочечной РНК с суммарной мол. массой $5 \cdot 10^6$. Вирусы имеют от семи до девяти главных полипептидов, включая транскриптазу (Р1-3) и нейраминидазу (NA). Вирусы обладают гемагглютинирующей активностью, обусловленной наличием гликопротеинового комплекса поверхностных выступов (NA1NA2). Репликация происходит в ядре (накоп-

ление белка N) и в цитоплазме, а сборка включает этап отпочковывания от плазматической мембраны. При смешанном заражении вирусы могут обмениваться сегментами генома.

Возбудители заболеваний человека

Influenzavirus: вирусы гриппа А и В.

Возбудители заболеваний животных

Influenzavirus: вирусы гриппа А и В. *Род без названия*: вирус гриппа С.

Семейство: Bunyaviridae [4] (буньявирусы) (рис. 2.16)

Род: Bunyavirus (супергруппа Буньямвера).

Род: Phlebovirus (вирусы москитной лихорадки).

Род: Nairovirus (вирусы, подобные вирусу Найроби овец).

Род: Uukivirus (вирусы, подобные вирусу Уукуниими).

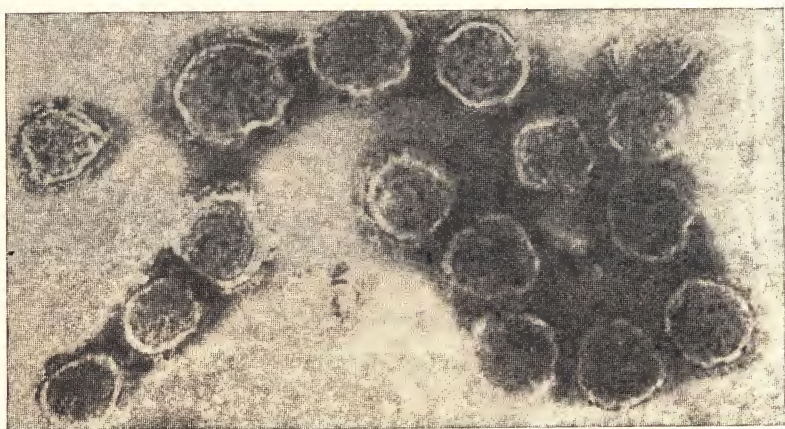


Рис. 2.16. Bunyaviridae: *Bunyavirus*, вирус Ла Кросс; $\times 117\,000$.

Свойства

Вирионы буньявирусов имеют липидсодержащую внешнюю оболочку с поверхностными выступами, которая окружает три кольцевых нуклеокапсида диаметром 2—2,5 нм. Диаметр частиц от 90 до 120 нм. Геном состоит из трех молекул «кольцевой» (концы удерживаются водородными связями) негативной одноцепочечной РНК с суммарной мол. массой $(4,5—7) \cdot 10^6$. Вирусы имеют четыре главных полипептида, включая транскрип-

тазу, и проявляют гемагглютинирующую активность за счет одного из двух поверхностных гликопротеинов. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка включает отпочковывание от мембран аппарата Гольджи. При совместном заражении близкородственные вирусы могут обмениваться участками генома.

Возбудители заболеваний человека

Bunyavirus: вирус Буньямвера, вирус Бвамба, вирус Орибока, вирус калифорнийского энцефалита, вирус Ла Кросс, вирус Тягиня. *Phlebovirus*: вирус неапольской москитной лихорадки, вирус сицилийской москитной лихорадки, вирус лихорадки долины Рифт. *Nairovirus*: вирус крымский геморрагической лихорадки (вирус Конго).

Возбудители заболеваний животных

Phlebovirus: вирус лихорадки долины Рифт. *Nairovirus*: вирус Найроби, вызывающий заболевание у овец.

Семейство: *Arenaviridae* [21] (аренавирусы) (рис. 2.17)

Под: *Arenavirus* (аренавирусы).

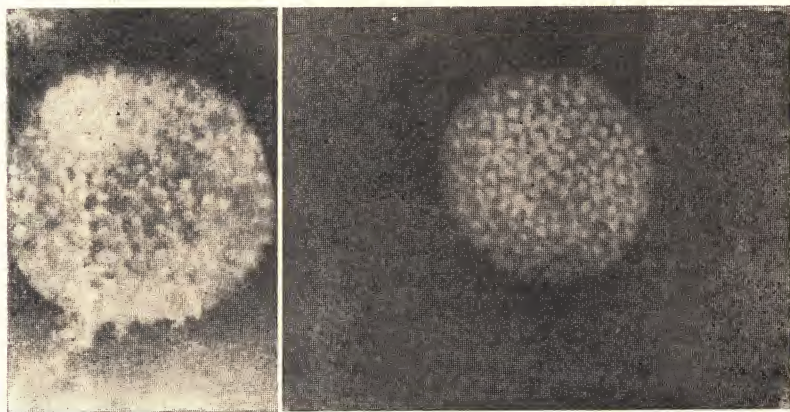


Рис. 2.17. *Arenaviridae*: *Arenavirus*, вирус лимфоцитарного хориоменингита (слева) и вирус Такарибе (справа); $\times 225\,000$.

Свойства

Вирионы аренавирусов имеют плейоморфную липидсодержащую оболочку с большими поверхностными выступами, внутри которой заключены два кольцевых или линейных нуклеокапсида

и разное число рибосомоподобных частиц. Диаметр вирионов от 50 до 300 нм (в среднем 110—130 нм). Геном состоит из двух молекул линейной или «кольцевой» (концы могут удерживаться водородными связями) негативной одноцепочечной РНК с суммарной мол. массой $(3,2—4,8) \cdot 10^6$. Вирусы имеют три главных полипептида, включая транскриптазу. За типоспецифическую серологическую реактивность ответствен поверхностный гликопротеин, а за перекрестную реактивность — нуклеокапсидный белок. Репликация осуществляется в цитоплазме, а сборка включает отпочковывание от плазматической мембраны. Поражающие человека вирусы Ласса, Мачупо и Хуни́н принадлежат к категории 4 особоопасных патогенов и работы с ними можно проводить только в лабораториях, оборудованных с соблюдением самых строгих мер техники безопасности.

Возбудители заболеваний человека

Arenavirus: вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Ласса, вирус Мачупо (боливийская геморрагическая лихорадка), вирус Хуни́н (аргентинская геморрагическая лихорадка).

Возбудители заболеваний животных

Arenavirus: вирус лимфоцитарного хориоменингита мышей и хомяков.

Семейство: Retroviridae [27] (ретровирусы) (рис. 2.18)

Подсемейство: Oncovirinae (группа РНК-содержащих онкогенных вирусов).

Род: (без названия) (онковирусы типа С).

Род: (без названия) (онковирусы типа В).

Род: (без названия) (онковирусы типа D).

Подсемейство: Spumavirinae (пенящие вирусы).

Род: Spumavirus (пенящие вирусы).

Подсемейство: Lentivirinae (вирусы группы висны/мэди).

Род: Lentivirus (вирусы группы висны/мэди).

Свойства

Вирионы ретровирусов имеют липидсодержащую внешнюю оболочку с поверхностными выступами, окружающую, вероятно, икосаэдрический капсид, который в свою очередь содержит, по-видимому, спиральный нуклеокапсид. Диаметр вирионов от 80 до 100 нм. Геном представлен инвертированным димером линейной позитивной одноцепочечной РНК с суммарной мол. мас-

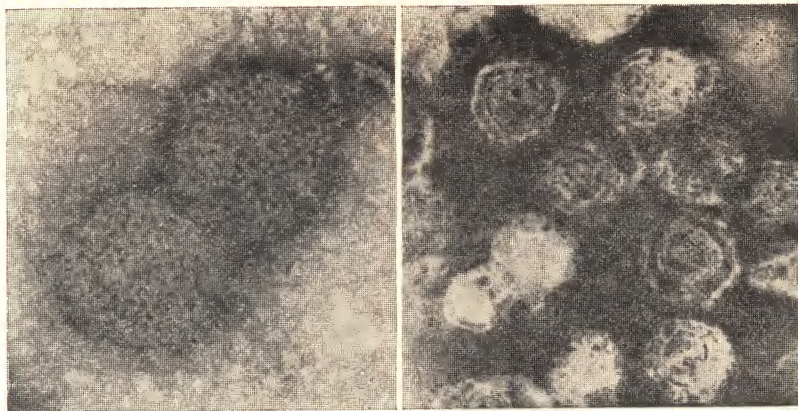


Рис. 2.18. Retroviridae: Oncovirinae: вирус опухолей молочных желез мышей (частицы типа В) (слева), $\times 135\,000$; вирус лейкемии мышей (частицы типа С) (справа), $\times 108\,000$.

сой $6 \cdot 10^6$. Вирусы имеют семь главных полипептидов, включая обратную транскриптазу. Поверхностные гликопротеины (env) содержат типоспецифические эпитопы, а внутренние белки (gag) несут перекрестно-реактивные (группоспецифичные) эпитопы. Репликация происходит в ядре (обратная транскрипция вирусной РНК с образованием ДНК, которая затем встраивается в ДНК клетки-хозяина) и в цитоплазме, а сборка включает отпочковывание от плазматической мембраны. Большинство вирусов онкогенны, вызывают лейкемии, лимфомы, опухоли молочных желез и опухоли нервной ткани.

Возбудители заболеваний человека

Т-лимфоцитарные вирусы человека (HTLV-I, II, III).

Возбудители заболеваний животных

Oncovirinae: вирус лейкемии крупного рогатого скота, вирусы саркомы и лейкемии кошек, вирусы лейкемии и саркомы павианов, гиббонов и шерстистых обезьян, вирусы ретикулоэндотелиоза, саркомы и лейкемии птиц, онковирусы пресмыкающихся, вирус опухолей молочных желез мышей. *Lentivirinae*: вирус прогрессирующей пневмонии мэди, вирус висны овец.

Семейство: Picornaviridae [6] (пикорнавирусы) (рис. 2.19)

Под: *Enterovirus* (энтеровирусы).

Под: *Cardiovirus* (вирусы, подобные вирусу энцефаломиокардита).

Под: *Rhinovirus* (риновирусы).

Под: *Aphthovirus* (вирусы ящура).

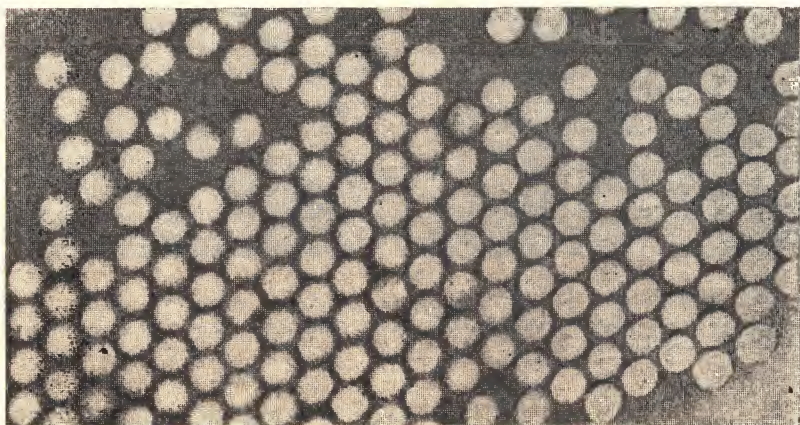


Рис. 2.19. Picornaviridae: *Enterovirus*, вирус полиомиелита типа 1, $\times 180\,000$.

Свойства

Вирионы пикорнавирусов не имеют внешней оболочки и обладают икосаэдрической симметрией; их диаметр 22—30 нм. Вирусные частицы содержат 60 субъединиц, образующих поверхностную решетку с $T=1$. Геном представлен одной молекулой позитивной одноцепочечной РНК с мол. массой $2,5 \cdot 10^6$. Вирусы имеют четыре главных полипептида. Репликация включает трансляцию гигантского полипротеина-предшественника и его посттрансляционное расщепление на функциональные полипептиды. Репликация и сборка происходят в цитоплазме; вирусные частицы высвобождаются из клетки при разрушении последней. Круг хозяев вирусов весьма узок.

Возбудители заболеваний человека

Enterovirus: полиовирусы типов 1, 2 и 3, вирусы Коксаки А1—22, 24 и В1—6, вирусы ЕСНО типов 1—9, 11—27 и 29—34, энтеровирусы человека типов 68—71, вирус гепатита А (энтеровирус человека типа 72). *Rhinovirus*: риновирусы человека типов 1—113.

Возбудители заболеваний животных

Enterovirus: вирус везикулярной болезни свиней, полиовирус мышей, энтеровирусы свиней типов 1—8, энтеровирусы крупного рогатого скота типов 1—7. *Cardiovirus*: вирус энцефаломиокардита. *Rhinovirus*: риновирусы крупного рогатого скота типов 1—2, риновирусы лошадей типов 1—2. *Aphthovirus*: вирусы ящура.

Семейство: *Caliciviridae* [25] (калицивирусы) (рис. 2.20)

Под: *Calicivirus* (калицивирусы).

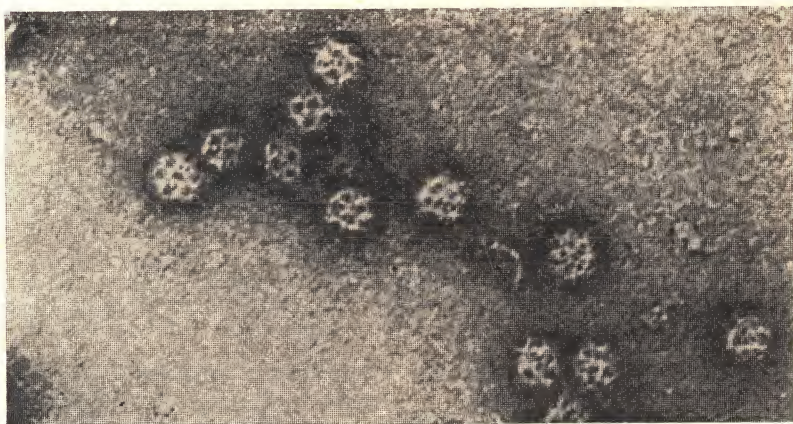


Рис. 2.20. *Caliciviridae: Calicivirus*, вирус везикулярной экзантемы свиней; $\times 225\,000$.

Свойства

Вирионы калицивирусов не имеют внешней оболочки. Они обладают икосаэдрической симметрией; их диаметр 35—39 нм. На поверхности вирусных частиц имеются 32 чашевидных вдавления, образующие поверхностную решетку с $T=3$. Геном представлен одной молекулой позитивной одноцепочечной РНК с мол. массой $(2,6—2,8) \cdot 10^6$. Вирусы содержат один главный полипептид и два минорных. Репликация и сборка происходят в цитоплазме, а вирусные частицы высвобождаются при разрушении клетки. Круг хозяев вирусов весьма узок.

Возбудители заболеваний человека

Calicivirus: предположительно вирус Норуок и сходные с ним вирусы, вызывающие гастроэнтериты. Другие калицивиру-

соподобные агенты, идентифицированные как предполагаемые возбудители гастроэнтеритов.

Возбудители заболеваний животных

Calicivirus: вирус везикулярной экзантемы свиней типов 1—12, вирус Сан-Мигуэль морских львов типов 1—8, калицивирусы кошек и, вероятно, свиней и телят.

Литература

1. Andrewes C. H. (1954). Nomenclature of viruses, *Nature* (London), 173, 260—261.
2. Andrewes C. H., Bang F. B., Burnet F. M. (1955). A short description of the Myxovirus group (influenza and related viruses), *Virology*, 1, 176—180.
3. Bachmann P. A., Hoggan M. D., Kurstak E., Melnick J. L., Pereira H. G., Tattersall P., Vago C. (1979). Parvoviridae: Second report, *Intervirology*, 11, 248—259.
4. Bishop D. H. L., Calisher C. H., Casals J., Chumakov M. P., Gaidamovich S. Y., Hanoun C., Lvov D. K., Marshall I. D., OkerBlom N., Pettersson R. F., Porterfield J. S., Russell P. K., Shope R. E., Westaway E. G. (1980). Bunyaviridae, *Intervirology*, 14, 125—143.
5. Brown F., Bishop D. H. L., Crick J., Francki R. I. B., Holland J. J., Hull R., Johnson K. M., Martelli G., Murphy F. A., Obijeski J. F., Peters D., Pringle C. R., Reichmann M. E., Schneider L. G., Shope R. E., Simpson D. I. H., Summers D. F., Wagner R. R. (1979). Rhabdoviridae, *Intervirology*, 12, 1—17.
6. Cooper P. D., Agol V. I., Bachrach H. L., Brown F., Ghendon Y., Gibbs A. J., Gillespie H. H., Lonberg-Holm K., Mandel B., Melnik J. L., Mohanty S. B., Povey R. C., Rueckert R. R., Schaffer F. L., Tyrrell D. A. J. (1978). Picornaviridae: Second report, *Intervirology*, 10, 165—180.
7. Dowdle W. R., Davenport F. M., Fukumi H., Schild G. C., Tumova B., Webster R. G., Zakstelskaja (1975). Orthomyxoviridae, *Intervirology*, 5, 245—251.
8. Fenner F. (1974). The classification of viruses: Why, when and how, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 52, 223—231.
9. Fenner F. (1976). Classification and nomenclature of viruses (Second Report of the ICTV), *Intervirology*, 7, 1—115.
10. Fenner F., Burnet F. M. (1957). A short description of the Poxvirus group (vaccinia and related viruses), *Virology*, 4, 305—310.
11. Kiley M. P., Bowen E. T. W., Eddy G. A., Isaacson M., Johnson K. M., Murphy F. A., Pattyn S. R., Peters D., Prozesky O. W., Regnery R. L., Simpson D. I. H., Slenzca W., Sureau P., vanderGroen G., Webb P. A. (1981). Filoviridae: A taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology*, 18, 24—32.
12. Kingsbury D. W., Bratt M. A., Choppin P. W., Hanson R. P., Hosaka Y., terMeulen V., Norrby E., Plowright W., Rott R., Wunner W. H. (1978). Paramyxoviridae, *Intervirology*, 10, 137—152.
13. Lwoff A., Horne R., Tournier P. (1962). A system of viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27, 51—55.
14. Matthews R. E. F. (1979). Classification and nomenclature of viruses (Third Report of the ICTV), *Intervirology*, 12, 132—296.
15. Matthews R. E. F. (1982). Classification and nomenclature of viruses (Fourth Report of the ICTV), *Intervirology*, 17, 1—199.

16. Matthews R. E. F., ed. (1983). A Critical Appraisal of Viral Taxonomy, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
17. Melnick J. L., Allison A. C., Butel J. S., Eckhart W., Eddy B. E., Kit S., Levine A. J., Miles J. A. R., Pagano J. S., Sachs L., Vonka V. (1974). Papovaviridae, *Intervirology*, 3, 106—120.
18. Murphy F. A. (1973). Taxonomy of vertebrate viruses. In: Handbook of Microbiology, 2d ed., edited by A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, pp. 623—637, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
19. Murphy F. A. (1983). Current problems in vertebrate virus taxonomy. In: A Critical Appraisal of Viral Taxonomy, ed. by R. E. F. Matthews, chap. 2, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
20. Norrby E., Bartha A., Boulanger P., Dreizin R. S., Ginsberg H. S., Kalter S. S., Kawamura H., Rowe W. P., Russell W. C., Schleisinger R. W., Wigand R. (1976). Adenoviridae, *Intervirology*, 7, 117—125.
21. Pfau C. J., Bergold G. H., Casals J., Johnson K. M., Murphy F. A., Pedersen I. R., Rawls W. E., Rowe W. P., Webb P. A., Weissenbacher M. C. (1974). Arenaviridae, *Intervirology*, 4, 207—218.
22. Porterfield J. S., Casals J., Chumakov M. P., Gaidamovich S. Y., Hanoun C., Holmes I. H., Horzinek M. C., Mussgay M., Okerblom N., Russell P. K., Trent D. W. (1978). Togaviridae, *Intervirology*, 9, 129—148.
23. Robinson W. S. (1979). Viruses of human hepatitis A and B. In: Comprehensive Virology, vol. 14, ed. by H. Frankel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 471—526, Plenum Press, New York.
24. Roizman B., Carmichael L. E., Deinhardt F., deThe G., Nahmias A. J., Plowright W., Rapp F., Sheldrick P., Takahashi M., Wolf K. (1982). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy, *Intervirology*, 16, 201—217.
25. Schaffer F. L., Bachrach H. L., Brown F., Gillespie J. H., Burroughs J. N., Madin S. H., Madeley C. R., Povey R. C., Scott F., Smith A. W., Studdert M. J. (1980). Caliciviridae, *Intervirology*, 14, 1—6.
26. Tyrrell D. A. J., Alexander D. J., Almeida J. D., Cunningham C. H., Easterday B. C., Garwes D. J., Hierholzer J. C., Kapikian A., Macnaughton M. R., McIntosh K. (1978). Coronaviridae: Second report, *Intervirology*, 10, 321—328.
27. Vogt P. K. (1976). The Oncoviridae—A definition of the group. In: Report No. 1 of WHO Collaborating Centre for Collection and Evaluation of Data on Comparative Virology, pp. 327—339, UNI-Druck, Munich.
28. Waterson A. P., Wilkinson L. (1978). An Introduction to the History of Virology, Cambridge University Press, London.
29. Wigand R., Bartha A., Dreizin R. S., Esche H., Ginsberg H. S., Green M., Hierholzer J. C., Kalter S. S., McFerran J. B., Pettersson U., Russell W. C., Waddell G. (1982). Adenoviridae: Second report, *Intervirology*, 18, 169—176.
30. Wildy P. (1971). Classification and nomenclature of viruses (First Report of the ICNV), *Monogr. Virol.*, 5, 181.

Принципы структурной организации вирусов

Стефан Харрисон¹

Вирусная частица — это структура, которая очень хорошо приспособлена для переноса нуклеиновой кислоты от одной клетки к другой. По сути она представляет собой внеклеточную органеллу. Переносимой нуклеиновой кислотой может быть как РНК, так и ДНК, и в обоих случаях встречаются частицы, самые разные по степени сложности. Существуют два принципиально различающихся типа вирусных частиц: частицы, имеющие оболочку — мембрану, представляющую собой липидный бислой, и частицы, лишенные такой оболочки. Это обуславливает различие в способе проникновения вируса в клетку и его высвобождения. Внутренняя структура многих вирусов с оболочкой сходна со структурой вируса, лишенного оболочки. Поэтому в данной главе мы будем рассматривать одновременно структуру вирусов, лишенных липидной оболочки, и внутреннюю структуру вирусов, обладающих ею. Организация вирусных оболочек обсуждается в гл. 4.

Типы структур

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть упакованы в вирусной частице двумя основными способами. Это приводит к образованию двух типов структур: палочковидных или нитевидных либо сферических, «изометрических». В палочковидных или нитевидных частицах белковые субъединицы связываются с нуклеиновой кислотой, располагаясь вдоль нее периодическим образом так, что она сворачивается в спираль. Наиболее известные примеры таких структур — вирусы растений, например вирус табачной мозаики (TMV). РНК миксо-, парамиксо- и рабдовирусов также входит в состав нитевидной структуры, что обусловлено ассоциацией РНК с белком N. При этом образуется конструкция, известная под названием нуклеокапсид, которая

¹ *Stephen Harrison*, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138.

в свою очередь тоже формирует спираль. В изометрических частицах нуклеиновая кислота уложена таким образом, что способ ее упаковки геометрически не связан с организацией оболочки. Например, в паповавирусах двухцепочечная кольцевая ДНК, связываясь с гистонами, образует самые настоящие нуклеосомы. В мелких вирусах растений — единственном случае, когда мы имеем относительно полное представление о способе упаковки нуклеиновой кислоты (РНК), — связи между белковым чехлом и РНК достаточно гибки, что налагает лишь незначительные ограничения на способ укладки РНК. Таким образом, между спиральными и изометрическими структурами имеется важное химическое различие — регулярные периодические взаимодействия между капсидом и нуклеиновой кислотой в одном случае и существенно более подвижные связи между чехлом и упакованной нуклеиновой кислотой в другом.

Для описания вирусных структур разработана довольно детальная номенклатура; в частности, в данной главе используются следующие понятия.

Субъединица, или *белковая субъединица*: единая, уложенная определенным образом полипептидная цепь (например, белок TMV, мол. масса 17 000).

Структурный элемент, или *структурная единица*: одна или несколько неидентичных белковых субъединиц, которые в совокупности образуют «химически завершенный» блок ансамбля более высокого порядка (например, VP1, VP2, VP3, VP4 у полиовируса или E1, E2, E3 у вируса леса Семлики).

Морфологический элемент, или *единица*: выступы или кластеры на поверхности частицы, которые видны в электронном микроскопе. Поскольку морфологические элементы не всегда соответствуют химически уникальным единицам, этот термин удобен только при описании электронных микрофотографий.

Капсид: белковый чехол, образующий комплекс с нуклеиновой кислотой. Иногда употребляется также термин «футляр», смысл которого ясен из контекста.

Нуклеокапсид: комплекс белка с нуклеиновой кислотой, представляющий собой упакованную форму генома вирусной частицы [например, сердцевина вируса Синдбис или нитевидный комплекс белка N и РНК в вирусе везикулярного стоматита (VSV), вирусе гриппа и т. д.]. Этот термин полезен в тех случаях, когда нуклеокапсид представляет собой некую подструктуру более сложной вирусной частицы.

Вирион: целая вирусная частица.

В этой главе мы обсудим молекулярную архитектуру ряда простых вирусов. Более подробное описание химических свойств и биосинтеза отдельных компонентов читатель найдет в соответствующих главах.

Принципы структурной организации вирусов

Принципы структурной организации вирусных частиц диктуются теми биохимическими свойствами, которыми должен обладать вирус, чтобы удовлетворять требованиям эффективной и безошибочной сборки, с одной стороны, и регулируемой разборки при проникновении в клетку-хозяина — с другой. Эти принципы отражены в трех свойствах, которым удовлетворяет организация большинства вирусных структур.

Первое свойство обусловлено тем, что вирусные подструктуры собираются из белковых субъединиц, обычно кодируемых вирусным геномом. Следовательно, в целях экономии генетического материала эти структуры должны состоять из большого числа идентичных копий одного или нескольких типов белков [18]. Вытекающее отсюда многократное повторение одинаковых белок-белковых взаимодействий требует *симметричного расположения субъединиц*. В противном случае при одном и том же наборе аминокислотных боковых цепей возникали бы разные системы нековалентных связей в разных местах, что привело бы к неоднозначностям при сборке. Палочко- и нитевидные вирусы, а также нитевидные нуклеокапсиды многих вирусов, обладающих оболочкой, имеют спиральную симметрию, а простые изометрические вирусы — икосаэдрическую. Часто у очень крупных вирусов симметрия маскируется из-за наличия множества небольших искажений (т. е. из-за локальных подвижек в уложенных белковых цепях на расстояние ~ 1 Å). Длинные нитевидные вирусные частицы могут быть гибкими, а большие изометрические не всегда обладают строгой сферической симметрией. Тем не менее принцип специфического взаимодействия между субъединицами, по-видимому, выполняется для всех ключевых взаимодействий, определяющих сборку частицы, во всех достаточно хорошо охарактеризованных структурах.

Второе важное свойство, которое проявляется у больших и более сложных вирусных структур, состоит в том, что частицы должны собираться из отдельных *субансамблей*. Самая впечатляющая иллюстрация этого свойства — сборка сложных бактериофагов, например бактериофага Т4 [14]. Головка, хвостовой отросток, хвостовые нити — все эти структуры собираются независимо, причем сборка осуществляется в строго определенной последовательности (рис. 3.1). Промежуточный продукт, образовавшийся на каждом конкретном этапе, служит зародышем для формирования следующего компонента. Например, субъединицы хвостового отростка фага Т4 не ассоциируют до тех пор, пока не сформируется базальная пластинка, на которой и начинается сборка. Аналогично вирус Синдбис или вирус леса Семлики отпочковываются только после образования нуклеокапсиды (гл. 4).

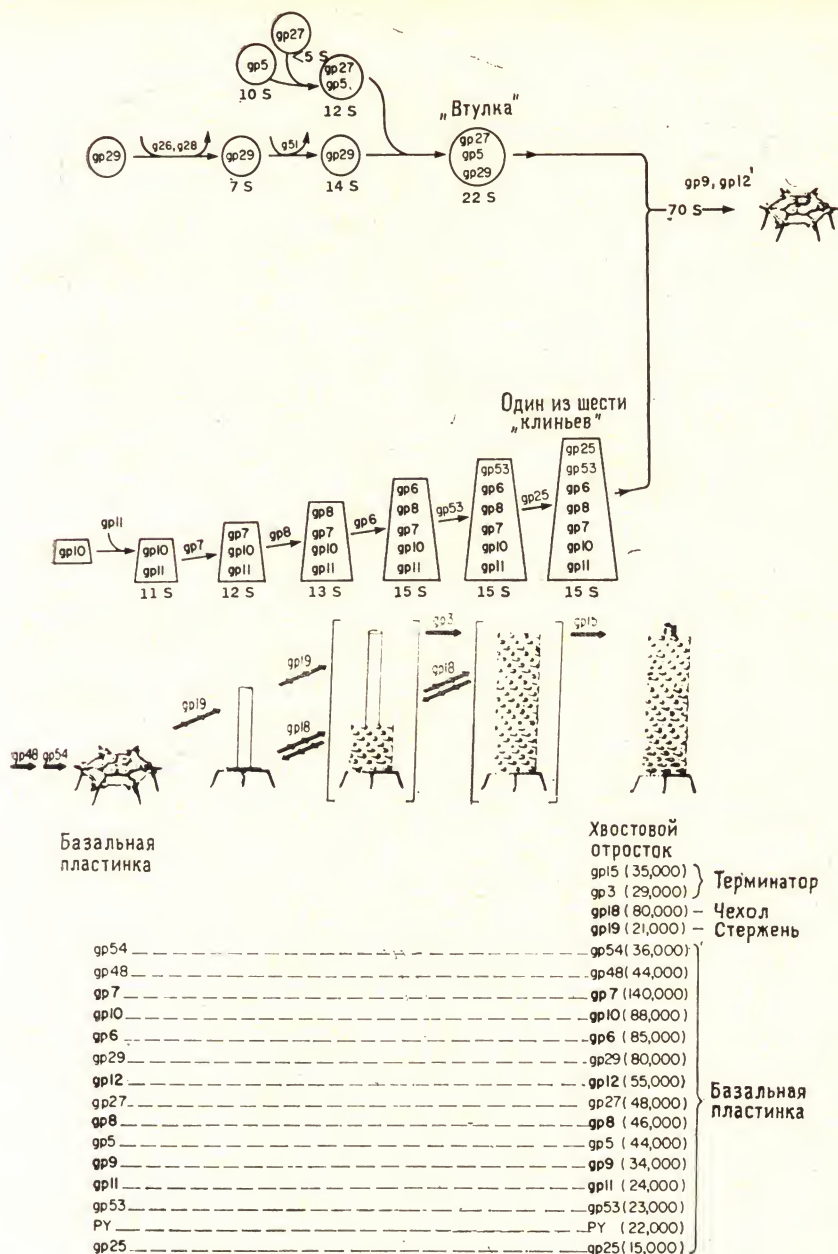


Рис. 3.1. Сборка хвостового отростка бактериофага Т4. На диаграмме подчеркивается важность порядка сборки сложных структур. Во время сборки хвостового отростка фага Т4 каждый белок может образовывать стабильный ассоциат лишь с непосредственным предшественником, т. е. с подструктурой, построенной на предыдущем этапе сборки. Ответвления отвечают образованию крупных субансамблей, которые, сформировавшись, начинают связываться друг с другом. (С любезного разрешения Дж. Кинга.)

И наконец, третье важное свойство вирусных частиц состоит в том, что, хотя включение в них вирусной нуклеиновой кислоты осуществляется специфично, в целом оно не зависит от информации, заключенной в большей части нуклеотидной последовательности. В случае спиральных структур, например TMV, каждая белковая субъединица взаимодействует с определенным числом нуклеотидов вне зависимости от нуклеотидной последовательности, хотя при инициации сборки (нуклеации), по-видимому, происходит предпочтительное связывание с определенным участком. В случае изометрических частиц конденсация молекулы нуклеиновой кислоты также, вероятно, не зависит от деталей ее вторичной и третичной структуры и от последовательности [21, 28]. Например, у вирусов, содержащих одноцепочечную РНК, для упаковки РНК в оболочку не требуется ее предварительной укладки; необходимо лишь, чтобы она имела нужный размер. Чем именно определяется специфическая конденсация нуклеиновых кислот у изометрических вирусов — пока неизвестно; вполне вероятно, что для этого нужны одна или несколько «упаковочных последовательностей». Ясно также, что механизм процесса частично зависит от того, упаковывается ли нуклеиновая кислота в готовую оболочку (как у ДНК-содержащих фагов) или происходит одновременная сборка белковых единиц и нуклеиновой кислоты.

Симметрия вирусных частиц

Спиральная симметрия

Симметрию спиральных структур удобно описывать с помощью двух параметров: числа единиц на виток u (это число не обязательно целое) и расстояния между единицами вдоль оси спирали p . Шаг спирали P равен pu . Спиральные структуры могут обладать поворотной осью симметрии, которая совпадает с осью спирали (например, хвостовой отросток бактериофага T4 обладает осью симметрии 6-го порядка), или системой осей 2-го порядка, перпендикулярных оси спирали (как в ДНК). Как видно из рис. 3.2, структуру со спиральной симметрией можно также описать, используя понятие «поверхностной решетки». При этом линии решетки соответствуют фрагментам различных спиральных линий — это также показано на рис. 3.2. Понятие поверхностной решетки особенно полезно в тех случаях, когда данная субъединица контактирует с двумя другими, расположенными на один оборот спирали выше или ниже ее. Можно представить, что спиральная структура образуется из плоской решетки замыканием ее в цилиндр (рис. 3.3). При этом разные

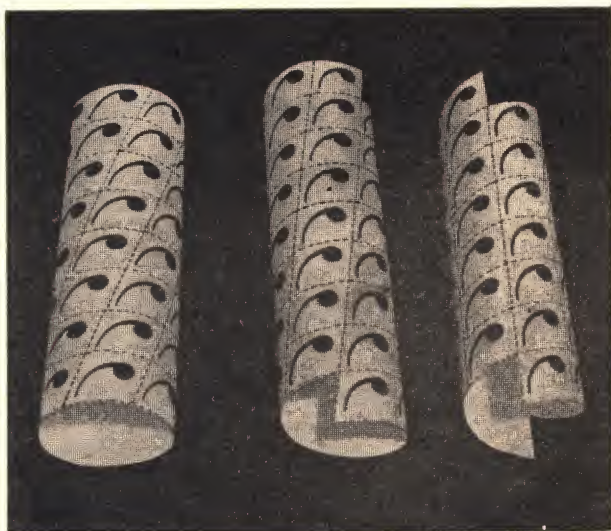
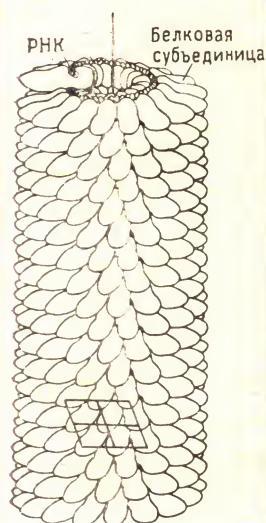


Рис. 3.2. Спиральная структура вируса табачной мозаики (TMV). На один виток приходится $16\frac{1}{3}$ субъединицы; шаг спирали равен 23 А. На каждой белковой субъединице в желобке располагаются три нуклеотида РНК. В нижней части рисунка показана поверхностная решетка (четыре «элементарные ячейки»).

Рис. 3.3. «Поверхностная решетка» (запятые соответствуют субъединицам), скрученная в спираль с «нулевым стартом», в одно- и двухзаходную спирали. Во всех случаях упаковка субъединиц одинакова.

структуры с близкими поверхностными решетками могут быть образованы замыканием трубки в спираль с нулевым стартом, двухзаходную или однозаходную спираль и т. д.

Икосаэдрическая симметрия

Большинство вирусных частиц с замкнутым чехлом обладает икосаэдрической симметрией (рис. 3.4). Это самая эффективная симметрия для конструирования замкнутого чехла из отдельных субъединиц: в этом случае при сборке чехла фиксированного размера используются строительные блоки минимального размера. На поверхности любой структуры с икосаэдрической симметрией имеется 60 идентичных элементов, связанных друг с другом осями симметрии 2, 3 и 5-го порядков.

Способ упаковки элементов в структуру с данной симметрией показан на рис. 3.5. В. Запятые, связанные осями симметрии 2-го порядка, расположены «лицом-к-лицу», связанные осями 3-го порядка — «затылком-к-затылку», а 5-го порядка — «хвост-

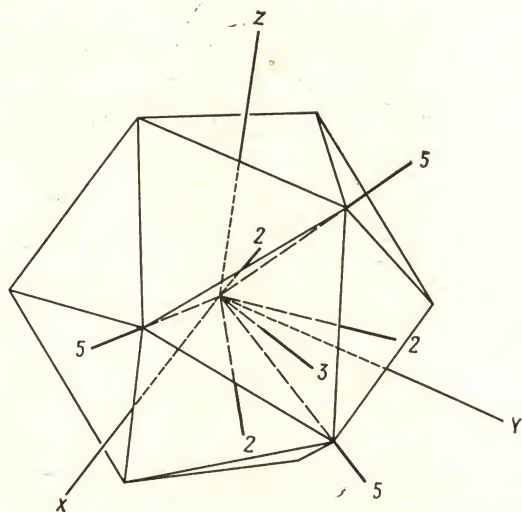


Рис. 3.4. Икосаэдр. Показаны некоторые элементы икосаэдрической симметрии: поворотные оси 2, 3 и 5-го порядков. Обратите внимание на важное различие между понятиями *симметрия* и *форма*. Симметрия — это главная особенность структуры. Ее можно определить как набор всех операций (в данном случае поворотов), которые переводят объект сам в себя. Форма — это всего лишь общий вид поверхности объекта. Многие объекты, обладающие икосаэдрической симметрией, имеют неикосаэдрическую форму, например пентагондодекаэдр. Действительно, многие вирусы, которые подчиняются икосаэдрической симметрии, *не* имеют формы икосаэдра.

том-к-хвосту». Замкнутые капсиды с симметрией более высокого порядка, чем икосаэдрическая, строго говоря существовать не могут. Молекула нуклеиновой кислоты большинства вирусов слишком велика, чтобы ее можно было упаковать в чехол из 60 субъединиц разумной молекулярной массы. Субъединица состоит из нескольких белковых цепей, иногда (например, в случае полиовируса) химически неидентичных [3]. Однако нередко эти цепи бывают «генетически эквивалентны», и тогда вирусный чехол состоит из $60n$ (где $n > 1$) идентичных структурных элементов. В связи с этим возникают две важные проблемы, касающиеся сборки. Поскольку не все субъединицы данного типа связаны друг с другом симметричным образом, то каждая субъединица в зависимости от ее местоположения в чехле оказывается включенной в один из нескольких возможных видов взаимодействия с соседями. Отсюда возникает первая проблема — проблема белковой архитектуры. Каким образом обеспечивается альтернативность связывания субъединиц? Вторая проблема — регулярность сборки: как в процессе сборки осуществляется столь точное переключение с одного вида взаимодействия на другой,

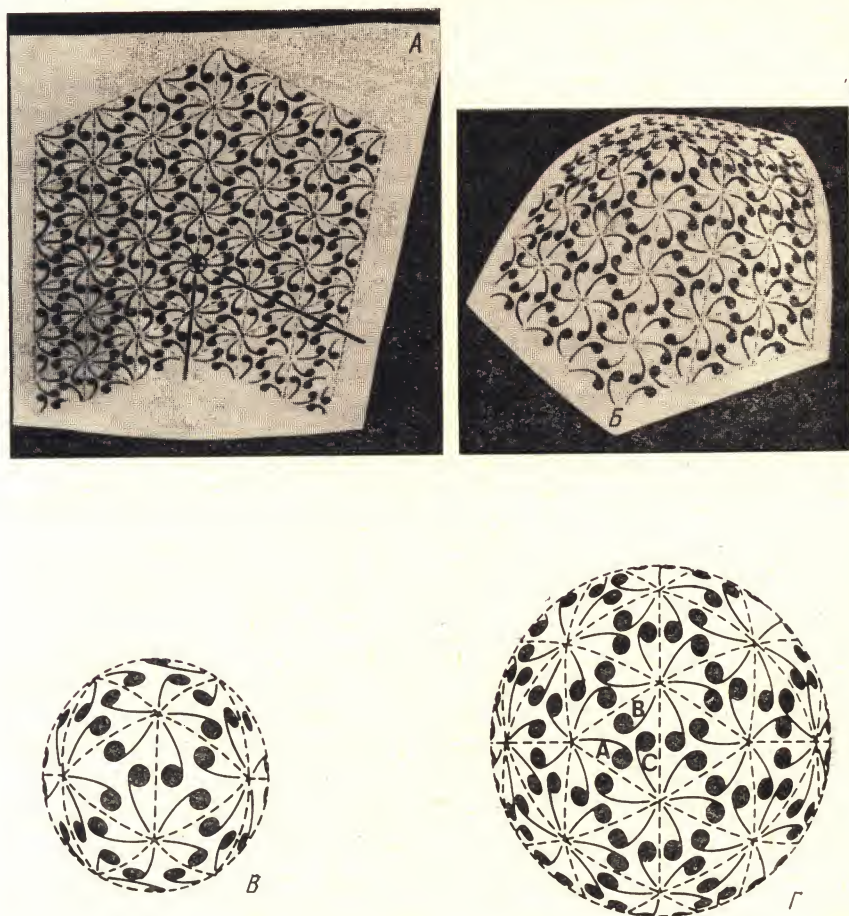


Рис. 3.5. А. Плоская гексагональная решетка. Запаятые соответствуют субъединицам. Точка, помеченная звездочкой, трансформируется в позицию с координацией 5. Б. В плоскую решетку можно ввести нужную кривизну, преобразовав позицию с координацией 6 в позицию с координацией 5. Для этого сегмент, отмеченный на рис. А, следует вырезать и соединить края разреза. Поскольку при такой процедуре удаляется каждая шестая субъединица, кажется невероятным, чтобы интермедиатом при сборке вируса мог служить плоский шестиугольник. Поэтому такой способ конструирования показан чисто формально. В. Структура, обладающая икосаэдрической симметрией и состоящая из 60 субъединиц. Г. Икосаэдрическая структура, состоящая из 180 субъединиц. Все 180 субъединиц образуют примерно одинаковые локальные контакты, однако строго говоря здесь возникает три вида упаковочных модулей. Они обозначены буквами А, В и С.

что в чехле не возникает нерегулярностей и не происходит его неправильного замыкания?

Каспар и Клуг [16] предложили одно из возможных решений первой проблемы, т. е. попытались ответить на вопрос, как могут возникать альтернативные типы связывания между субъединицами одного вида. Почти полная идентичность контактов между 60 n субъединицами в икосаэдрическом капсиде может быть получена следующим образом. Рассмотрим гексагональную плоскую решетку из идентичных элементов (рис. 3.5, А). Из такой решетки можно получить икосаэдрическую оболочку, удалив «ломтики» в 60° и «сшив» края разрезов (рис. 3.5, Б). Через каждую вершину такого икосаэдра проходит ось 5-го порядка. Если удалить «ломтик» у каждой из вершин гексагональной решетки, то получится икосаэдр из 60 субъединиц с идентичными межсубъединичными контактами (рис. 3.5, В). Эти контакты аналогичны контактам в исходной гексагональной решетке, хотя наличие у оболочки кривизны подразумевает, что элементы конечной толщины не смогут полностью сохранить в икосаэдрической структуре те же связи, которые существовали между ними в плоской решетке. Если вырезать «ломтики» из каждого второго ближайшего соседа, получится оболочка большего размера — из 180 субъединиц, а не из 60. При этом все контакты будут сходны, однако в действительности субъединицы окажутся разбитыми на три типа. На рис. 3.5, Г они обозначены буквами А, В и С. Отметим, что среди контактов, стабилизирующих эту структуру, будут присутствовать связи трех типов: «голова-к-голове» — между парами субъединиц, «спина-к-спине» — объединяющие в кольцо три элемента и «хвост-к-хвосту» — замыкающие кольцо из пяти или шести элементов. Каждая субъединица будет участвовать во всех трех типах взаимодействия. Таким образом, несмотря на различия в деталях упаковки субъединиц А, В и С, с точки зрения образуемых ими контактов они очень сходны. Например, все субъединицы образуют контакты типа «хвост-к-хвосту», но субъединицы А-типа замыкаются в кольцо из пяти элементов, как в простых ансамблях из 60 субъединиц, а субъединицы В- и С-типов — из шести. Контакты типа «хвост-к-голове» вообще отсутствуют. Гомологичные участки субъединиц всех классов образуют примерно одинаковые контакты. Такое связывание было названо Каспаром и Клугом [16] «квазиэквивалентным», чтобы подчеркнуть, что все субъединицы образуют сходные, хотя и неидентичные контакты. Каспар и Клуг отметили, что нековалентные связи в белках обладают определенной лабильностью и это позволяет генетически и химически идентичным молекулам образовывать неидентичные контакты. Подобная упаковка (правда, немного отличающаяся от описанной выше) действительно наблюдается в случае вируса кустис-

той карликовости томатов (TBSV) и некоторых других вирусов. Это подтверждает постулат о «близко родственных» специфических взаимодействиях. Структура TBSV указывает также на возможный регуляторный механизм «переключения» субъединицы с одного типа взаимодействия на другой, т. е. она иллюстрирует по крайней мере одно из возможных решений *второй* проблемы, на которую указывалось в начале главы.

О структурах, подобных представленным на рис. 3.5, В и Г, иногда говорят, что они построены из пентамеров и гексамеров. Это действительно так, если связи «хвост-к-хвосту» особенно прочны. Если все контакты, кроме контактов «хвост-к-хвосту», разрушить, структура, изображенная на рис. 3.4, Г, распадется на 12 пентамеров и 30 гексамеров. Часто субъединицы бывают снабжены выступающим наружу элементом, расположенным так, что на электронно-микроскопических фотографиях многих структур действительно наблюдаются группы из пяти и шести выступов. Это явление называли пентамерно-гексамерной кластеризацией. Примером такого рода может служить ССМВ [3а]. Подобные кластеры — чисто морфологические образования. По ним можно судить о форме поверхности субъединиц, а также о том, каким образом они контактируют друг с другом. В действительности большинство изученных вирусов, которые состоят из 180 субъединиц (например, ССМВ), при диссоциации в мягких условиях распадаются на *димеры*. Следовательно, несмотря на выступы, которые дают характерную картину при негативном контрастировании, «попарные» контакты («голова-к-голове») являются самыми прочными. Таким образом, описание структуры, при котором выделяются как особо важные контакты 5-го и 6-го порядков, неадекватно. Аналогично термин «капсомеры», использующийся при описании выпуклых колец из пяти или шести выступающих элементов, которые видны в электронном микроскопе при негативном контрастировании, полезен только в том случае, если эти структуры соответствуют химически значимым элементам.

Возможны и другие типы икосаэдрической упаковки, включающие более 180 субъединиц. Если плоскую решетку, показанную на рис. 3.5, А, разрезать по каждому третьему ближайшему соседу, то получится структура, состоящая из 240 субъединиц. Если обобщить такой способ конструирования, то мы увидим, что число $T = h^2 + hk + k^2$ (где h и k — целые) дает возможные значения n для величины $60n$, равной числу субъединиц в частице, при этом для $T=7$ (и многих триангуляций более высокого порядка) имеются две энантиоморфные возможности. Число T , равное частному от деления числа субъединиц на 60, называется *триангуляционным числом*. Были обнаружены структуры, характеризующиеся значениями $T=1$ (сателлитный вирус некроза

табака, STNV; бактериофаг ϕ X174; полиовирус и т. п.), $T=3$ (многие РНК-содержащие вирусы растений), $T=4$ (вирус Синд-бис, вирус леса Семлики и родственные вирусы) и $T=7$ (головки бактериофагов λ и P22) [13]. У еще более крупных вирусов встречаются разные типы субъединиц в вершинах 5-го порядка, а также другие отклонения от простых геометрических принципов, которые вытекают из исходной решетки р6. Сборка таких сложных структур осуществляется в строго определенной последовательности, как, например, в случае хвостового отростка фага T4 (рис. 3.1), когда один ряд белковых субъединиц служит остовом, или адаптором, для другого. Таким образом, простое построение, которое приводит к «разрешенным» значениям триангуляционного числа, не подходит для случая икосаэдрических частиц большого размера, потому что многие из этих частиц формируются на основе структур меньших размеров. Однако субтриангуляции икосаэдрической поверхностной решетки позволяют получить *плотную упаковку* субъединиц на поверхности даже тогда, когда локальная симметрия их контактов не является гексагональной. Другими словами, узлы гексагональной решетки отвечают позициям самой плотной упаковки и тогда, когда объекты не обладают симметрией 6-го порядка, т. е. когда взаимодействие субъединицы данного объекта с шестью ближайшими соседями неодинаково. Уложенные таким образом белковые олигомеры образуют хороший защитный чехол и, по-видимому, именно это обстоятельство является ответом на вопрос, почему частицы аденовируса имеют вид структур с $T=25$, а паповавирусов — с $T=7$, хотя реальная локальная симметрия не отвечает решетке р6 (см. ниже).

Примеры вирусных структур

Сведения об архитектуре вирусов были получены в основном в результате электронно-микроскопических исследований негативно-контрастированных препаратов вирусных частиц и биохимического анализа отдельных вирусных компонентов. Детальную структуру нескольких вирусов растений, лишенных оболочки, удалось установить с помощью рентгеновской дифракции. Мы рассмотрим вначале два таких вируса — табачной мозаики и кустистой карликовости томатов, — поскольку структурная трактовка микроскопических и биохимических данных о вирусах животных в значительной степени зависит от сведений об известных структурах. Новую, сравнительно подробную информацию о вирусах животных, по-видимому, дадут в скором времени кристаллографические исследования адено- [8] и полиовирусов [30]. Структуру гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа мы опишем в следующей главе.

TMV

Частица TMV (рис. 3.2) имеет форму палочки; она состоит из 2130 субъединиц (по 158 аминокислотных остатков в каждой), уложенных в спиральную структуру, в которой на виток приходится $16\frac{1}{3}$ субъединиц. Диаметр спирали равен 180 Å, а расстояние между субъединицами вдоль оси спирали — 23 Å, т. е. длина стержня составляет 3000 Å. РНК закручена в спираль коаксиально с белком, при этом с каждой белковой субъединицей связано три нуклеотида. При различных условиях вирусная частица может диссоциировать на белок и РНК. Очищенный белок в зависимости от pH, ионной силы и других параметров дает различные ассоциативные формы (см. ниже), а самый важный ассоциат — диск — удалось закристаллизовать [4]. Диск представляет собой двухслойную структуру из 34 субъединиц. Субъединицы в каждом слое имеют одинаковую аксиальную ориентацию и контактируют друг с другом почти так же, как в самой вирусной частице (рис. 3.6). На рис. 3.7 приведено схематическое изображение субъединиц в составе диска. Переход от диска к спирали в процессе сборки частицы можно представить следующим образом. Разорвем два кольца вдоль одной радиальной линии и сдвинем края так, чтобы образовалась «пружинная шайба», после чего модифицируем спираль до получения вместо 17 субъединиц на виток $16\frac{1}{3}$. Наклон субъединиц изменится и станет равным -10° . Отметим, что при этом латеральные взаимодействия остаются практически прежними, а аксиальные полностью меняются. Петля полипептидной цепи, которая формирует внутреннюю часть субъединицы, в диске разупорядочена, но в составе вириона упорядочивается. Поскольку в вирусе эта петля действует как «зажим» для РНК (рис. 3.7), переход беспорядок—порядок весьма важен. Стаббс и др. [47] предложили следующую модель связывания тринуклеотида РНК в TMV. Полинуклеотидная цепь проходит между белковыми субъединицами на расстоянии ~ 40 Å от оси вирусной частицы, основания РНК обхватывают LR-спираль верхней белковой субъединицы с трех сторон, при этом основные аминокислотные остатки находятся в таких положениях, что нейтрализуют отрицательный заряд фосфатов РНК.

Как показал знаменитый опыт Френкель-Конрата и Вильямса [25] по реконструкции TMV из РНК и белка, при физиологических условиях происходит самосборка частиц. Этот эксперимент, проведенный с использованием очищенных компонентов, был очень важен, поскольку из него следовало, что структура вируса отвечает энергетическому минимуму и что внутри клетки и *in vitro* сборка может осуществляться самопроизвольно, без участия каких бы то ни было матриц. Как видно из рис. 3.8,

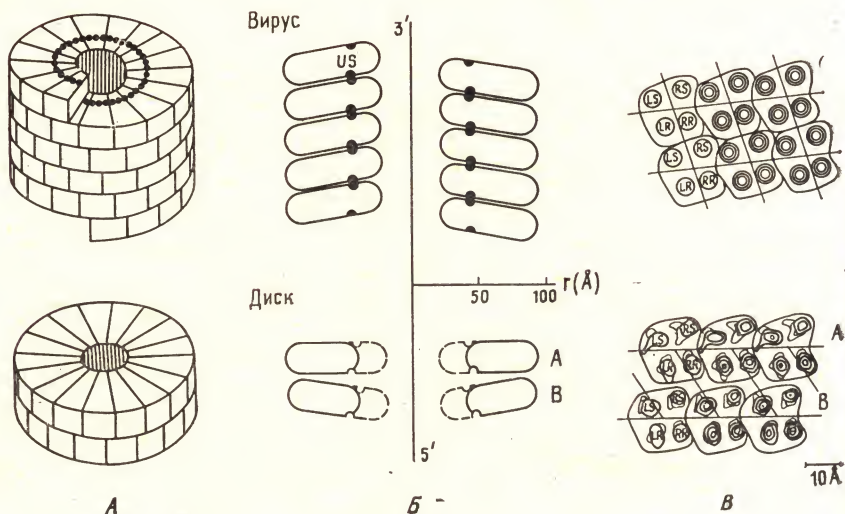


Рис. 3.6. Укладка белковых субъединиц в диске TMV (внизу) и в вирусной частице (вверху). А. Диск состоит из двух колец по 17 субъединиц в каждом. В вирусе на виток спирали приходится $16 \frac{1}{3}$ субъединицы. Б. Разрез вдоль оси спирали и диска, иллюстрирующий различный наклон субъединиц. В диске внутренняя часть субъединиц разупорядочена (показана пунктиром), что, по-видимому, облегчает связывание с РНК. В. Поперечный разрез нескольких субъединиц в диске и в вирусной частице (вид снаружи по направлению к оси). Поперечный разрез диска — это карта электронной плотности, а разрез вирусной частицы — схема. Главная часть каждой субъединицы включает четыре α -спирали (LS, RS, RR и LR), оси которых направлены примерно по радиусу. При переходе диск—спираль субъединицы проскальзывают одна над другой на расстоянии 10 Å. (Из [36], с разрешения автора.)

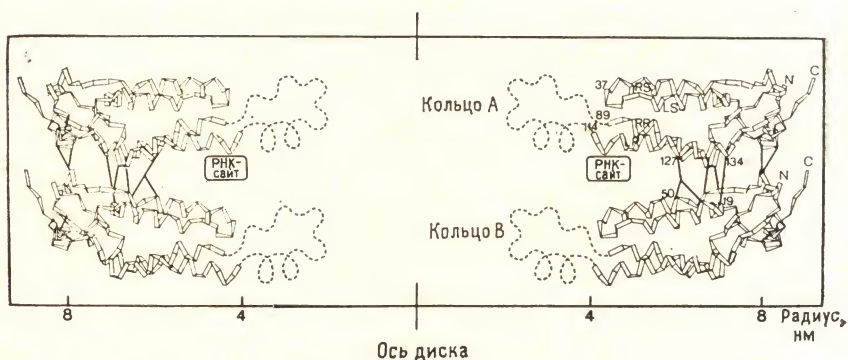


Рис. 3.7. Более детальное изображение разреза диска TMV, показанного на рис. 3.6, Б. Изображена полипептидная цепь. (Из [36], с разрешения автора.)

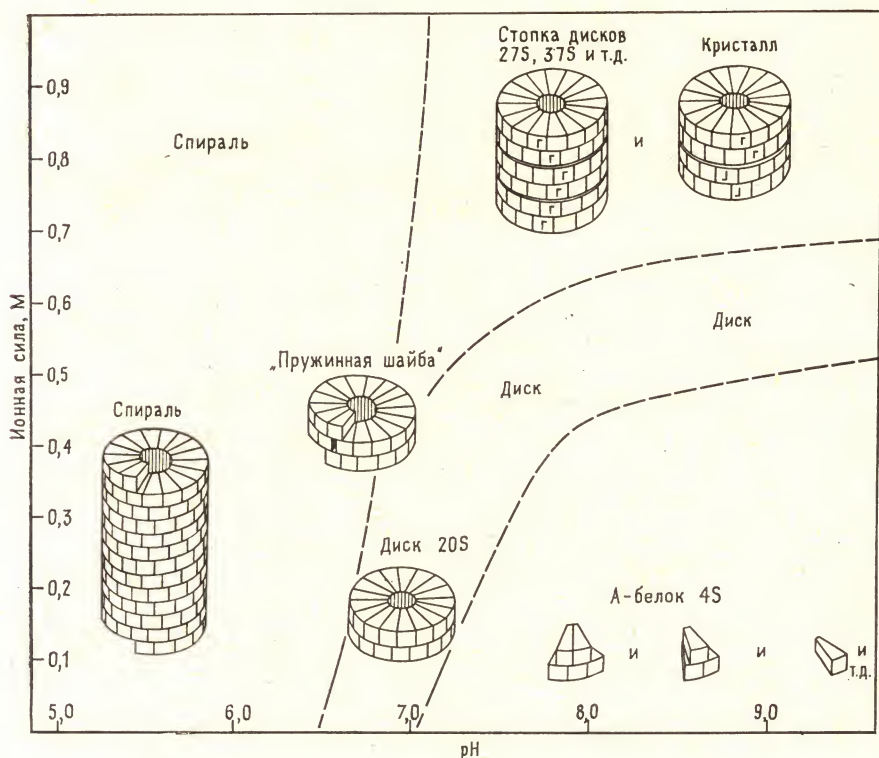


Рис. 3.8. Ассоциаты, образуемые белковыми субъединицами TMV при разных значениях pH и ионной силы. (Из [36], с разрешения автора.)

белковые субъединицы TMV могут образовывать самые разнообразные структуры [9]. Приведенная на рисунке «фазовая диаграмма» свидетельствует об одной очень важной особенности — структурном полиморфизме: при низких значениях pH или в присутствии РНК образуются спиральные структуры, при нейтральных и более высоких pH — структуры из дисков. Регуляция этого процесса путем изменения pH обусловлена поведением определенных карбоксильных групп (боковых цепей Asp и Glu), которые в вирусе титруются аномальным образом, поскольку в спиральном ансамбле они сближены [15]. Напряжение в структуре, возникающее из-за этого сближения, снимается в диске при связывании протонов. Если внутри спиральной структуры навита РНК, напряжение снимается даже при нейтральных pH, когда карбоксильные группы полностью депротонированы. Протоны играют важную роль в регуляции сборки, потому что

диски в сборке выполняют функцию интермедиатов. *In vitro* сборка протекает существенно быстрее, если добавлять белковую составляющую в виде диска, а не в виде «А-белка». Этот факт показывает, что диск играет центральную роль в процессе инициации, а возможно, и элонгации сборки [10]. Последовательность этапов сборки, как ее представляют в настоящее время, показана на рис. 3.9 [11, 36, 38]. Инициаторная петля РНК, расположенная на расстоянии ~ 1000 нуклеотидов от 3'-конца (соответствует 5'-концу цистрона оболочки), встраивается в центральное отверстие диска [33, 49]. При этом разупорядоченная петля полипептидной цепи и наклоненные субъединицы образуют как бы открытые «челюсти», в глубине которых располагается РНК-связывающий центр. Нуклеотидная последовательность имеет что-то наподобие повторов, по-видимому, не случайных. Например, каждым третьим основанием является G. Возможно, для превращения аксиальных субъединичных контактов из дископодобных в спиралеподобные достаточно связывания какого-то начального участка, содержащего такие тринуклеотиды. Подобное связывание могло бы приводить к появлению в диске дислокации и к образованию точки роста спирали. Последующий рост осуществляется в двух направлениях. Эксперименты по сборке ясно показали, что сначала происходит быстрая элонгация спирали в направлении 5'-конца, с протягиванием РНК через отверстие вверх, и существенно более медленный рост в направлении 3'-конца. Как видно из рис. 3.9, диск может играть определенную роль в процессе 5'-элонгации, но 3'-элонгация осуществляется в результате присоединения субъединиц.

Такой механизм сборки существенно сложнее, чем простое добавление субъединиц по винтовой дислокации, первоначально предложенное Уотсоном. По-видимому, он имеет какие-то важные селективные преимущества. Вирусная субъединица, входящая в состав ансамбля, должна быть способна к аккомодации любого триплета РНК. Незначительное предпочтение определенной нуклеотидной последовательности (например, последовательности с гуанином в каждой третьей позиции) может обеспечить нужную степень специфичности лишь при условии, что инициаторная область достаточно велика [31]. Отсюда становится очевидным важное значение диска для нуклеации сборки. Во время элонгации вирусная частица играет для РНК роль «расплетающего белка» — она расплетает спиральные участки молекулы. Наличие петли со стороны 5'-конца РНК может способствовать кооперативному присоединению субъединиц, в результате которого происходит раскручивание РНК на другом конце аксиального отверстия [36].

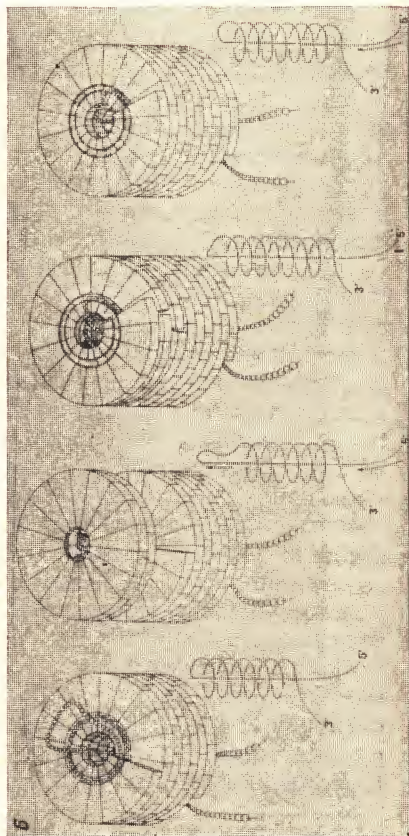
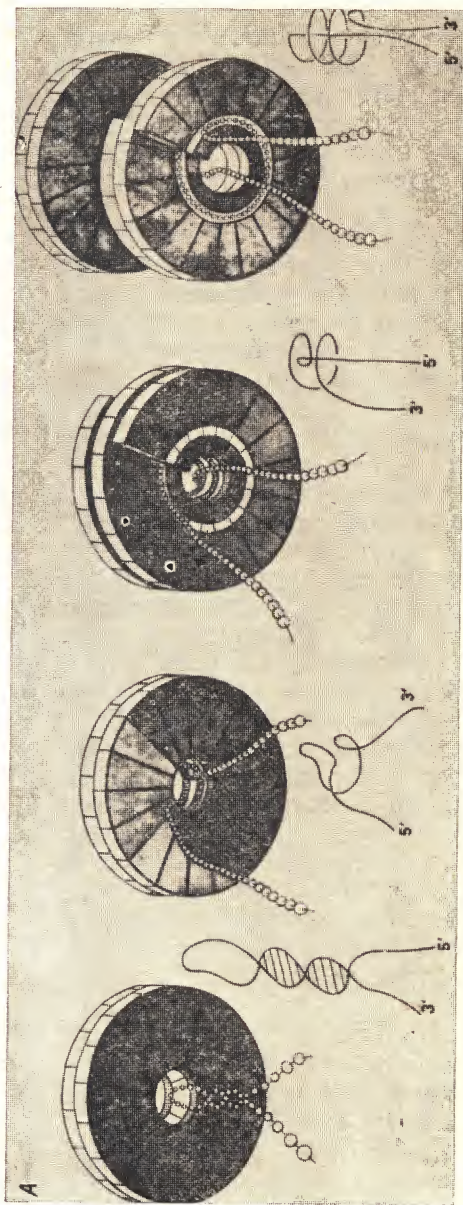


Рис. 3.9. Модель сборки ТМВ. Процессы инициации (А) и элонгации (Б) иллюстрируют важное значение диска, который играет роль промежуточной субструктуры. (Из [36], с разрешения автора.)

Вирус кустистой карликовости томатов (TBSV) и родственные вирусы

Представление о том, как устроена икосаэдрическая вирусная частица, сформировалось на основании данных по рентгеновской дифракции на монокристаллах TBSV [28]. TBSV — это икосаэдрическая структура, характеризующаяся $T=3$. Частица состоит из 180 белковых субъединиц капсида (мол. масса 42K)¹, возможно, одной белковой молекулы с мол. массой 80K и одноцепочечной РНК (~4800 нуклеотидов). Общая архитектура TBSV показана на рис. 3.10.

Белковая субъединица капсида, состоящая из 386 аминокислотных остатков, уложена так, что при этом образуется несколько пространственных модулей — выступающий домен (Р), домен, участвующий в формировании чехла с плотной упаковкой (S), соединительная «рука» (а) и внутренний домен (R). Три различные позиции (или три различных окружения) субъединицы обозначаются буквами А, В и С. Полипептид «подстраивается» под эти три упаковочные позиции с помощью шарнирного движения между доменами S и Р, а кроме того, путем упорядочивания или разупорядочивания части «руки». Субъединицы в позициях А и В (по 60 в каждой) имеют одинаковую конфигурацию шарнирной области и пространственно неупорядоченную N-концевую область («руку» и R-домен). У субъединиц в позиции С конфигурация шарнира иная, а соединительная «рука» уложена определенным образом вдоль нижней части S-домена. Положение R-домена относительно других частей субъединицы не фиксировано, поэтому он не виден на карте электронной плотности высокого разрешения, хотя сам по себе и обладает вполне регулярной структурой. Таким образом, N-концевая часть субъединицы состоит из хорошо структурированного R-домена, подвижно связанного с S-доменом, который жестко фиксирован в вирусном капсиде. Неупорядоченная часть крепления у субъединиц А и В гораздо протяженнее (в данном случае это вся соединительная «рука»), чем у субъединицы С (по-видимому, всего несколько остатков). Упаковка внутри вирусной частицы настолько плотная, что соединительные «руки», R-домены и РНК, вероятно, не перемещаются относительно друг друга [41].

Самая замечательная особенность TBSV — переплетение соединительных «рук» С-субъединиц, благодаря которому образуется некий внутренний каркас. Как показано на рис. 3.11, эти «руки» тянутся вдоль внутреннего края S-домена и «охватывают» ось икосаэдра 3-го порядка. «Руки» трех С-субъединиц кон-

¹ Здесь и далее К — это килодальтоны. — Прим. ред.

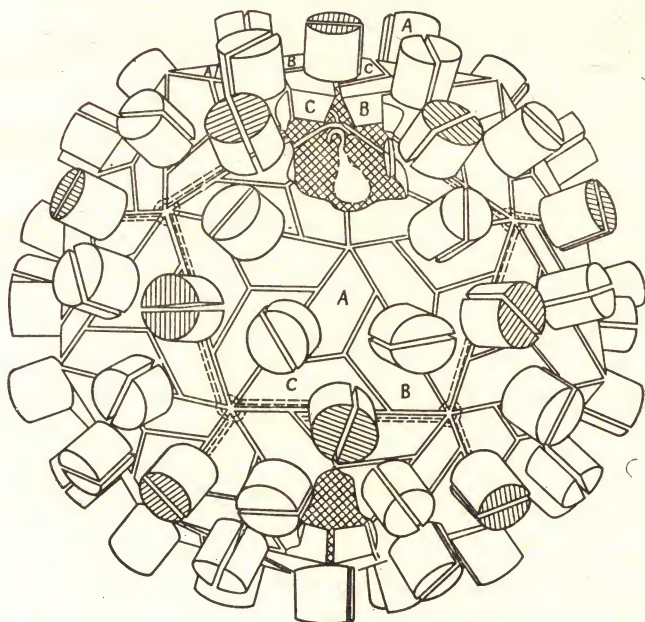
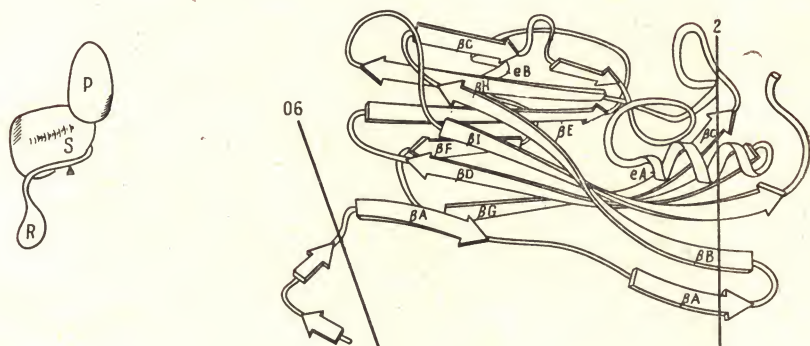


Рис. 3.10. Молекулярная архитектура вируса кустистой карликовости томатов (TBSV). Этот РНК-содержащий вирус представляет собой простую икосаэдрическую частицу из 180 субъединиц. Белок оболочки 40К в глобуле формирует три домена (R, S, P) и соединительную «руку» (а). Между доменами S и P имеется шарнир (h). У 60 субъединиц (заштрихованные субъединицы в позициях С) «рука» располагается напротив S-домена, а у остальных 120 (позициях А и В) она вытянута и разупорядочена. Вверху справа показано расположение доменов вдоль последовательности от N- до С-конца; вверху слева изображена субъединица, уложенная в глобулу, а внизу представлена упаковка субъединиц в вирусной оболочке. Заштрихованы S-домены и С-субъединицы.

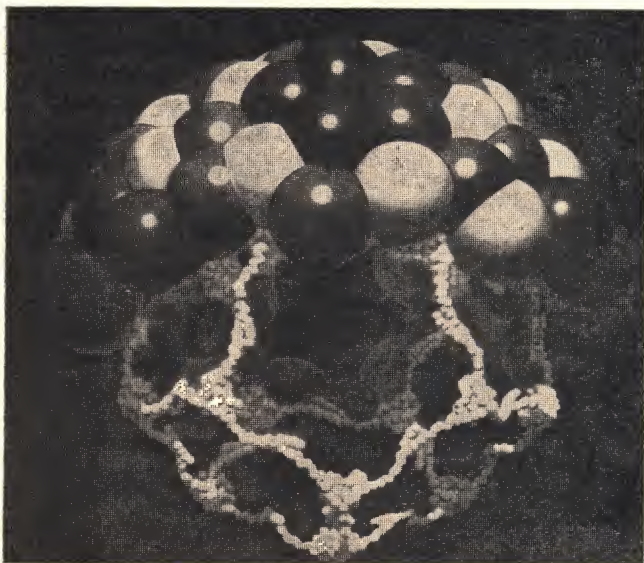


Рис. 3.11. Модель частицы TBSV, иллюстрирующая роль соединительных «рук» в фиксации размера вириона. Сферы изображают S- и P-домены 180 субъединиц (А — серые, В — белые, С — черные). Маленькие шарики — аминокислотные остатки последовательности «руки» (обозначена буквой «а» на рис. 3.10) для 60 субъединиц С. Аналогичные части субъединиц А и В в вирусе разупорядочены. Видно, что «руки» С-субъединиц вытянуты вдоль внутреннего края S-домена. При этом каждая «рука» переплелась «пальцами» с двумя другими, образовав фиксированный внутренний каркас. Узлы этого каркаса образованы тремя β-цепями (см. рис. 3.10).

тактируют друг с другом, в результате все 60 С-субъединиц образуют связанную сеть. Функция этого внутреннего каркаса состоит в том, что он точно задает правильное триангуляционное число, т. е. обеспечивает правильное замыкание вирусной частицы во время сборки.

Междоменные поверхности у TBSV описаны довольно подробно. Показано, что гомологичные части субъединиц образуют сходные контакты, о чем мы уже говорили при описании «квазиэквивалентности». Состояние контакта в данном конкретном положении однозначно определяется тем, разупорядочена или упорядочена «рука». Таким образом, при сборке используется способность данной субъединицы связываться специфическим, хотя и не строго однозначным образом (квазиэквивалентно), причем предотвращение ошибок при сборке обеспечивается не только этим свойством.

Карты электронной плотности TBSV, полученные в результате кристаллографических исследований, не позволили идентифи-

цировать упаковку молекулы РНК, поскольку и нуклеиновая кислота, и R-домены пространственно разупорядочены. R-домены, а также внутренняя поверхность S-доменов несут большое количество положительно заряженных остатков, которые нейтрализуют заряд примерно у $\frac{3}{4}$ фосфатных групп РНК. Относительно упаковки РНК можно сделать следующий основной вывод: она не предъявляет никаких особых требований к конфигурации РНК, кроме требования компактности, поскольку R-домен закреплен на оболочке подвижно. По-видимому, это общая особенность упаковки РНК в сферических вирусах. Отсутствие жесткой пространственной упорядоченности и напряжений в структуре РНК подразумевает, что для ее упаковки в частицу не нужно разрушать вторичную структуру молекулы. В этом состоит важное отличие от организации TMV и других спиральных вирусов.

Образование хелатных комплексов с двухвалентными катионами при $\text{pH} > 7,0$ приводит к обратимому разбуханию частицы TBSV (рис. 3.12). Подобные структурные изменения свойственны и многим другим вирусам. Например, аналогичное явление наблюдается при созревании головок фагов, содержащих двухцепочечную ДНК.

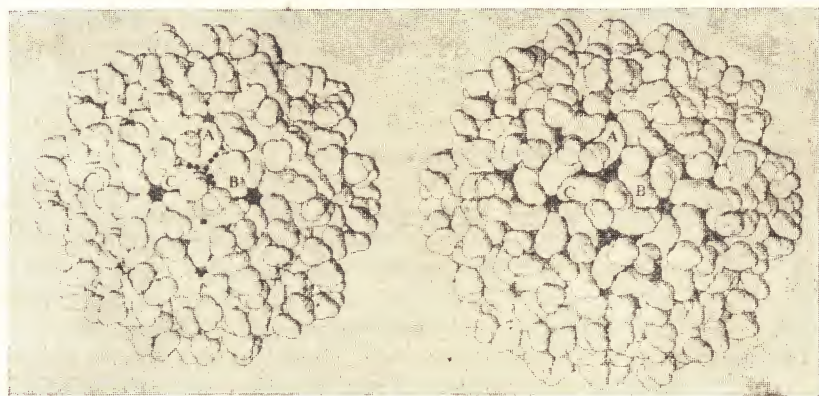


Рис. 3.12. Разбухание частиц TBSV в присутствии двухвалентных катионов. В компактной структуре (слева) в местах контактов между субъединицами имеются центры связывания Ca^{2+} , представленные во всех эквивалентных позициях. В каждом из этих мест было обнаружено по два иона Ca^{2+} , лигандами которых являются остатки аспарагиновой кислоты из соседних S-доменов. При удалении Ca^{2+} и увеличении pH выше 7,0 контакты между этими поверхностями нарушаются из-за отталкивания зарядов. Субъединицы расходятся, что и приводит к разбуханию частицы (справа). Другие контакты между S-доменами консервативны; переплетение «пальцев» у «рук» C-субъединиц (рис. 3.11) не нарушается [45a].

С помощью рентгеновской кристаллографии была установлена также структура двух других РНК-содержащих вирусов растений: сателлитного вируса некроза табака (STNV) [40] и вируса южной мозаики бобов (SBMV) [1]. Белки оболочки всех трех вирусов на удивление сходны. Вирион SBMV — это частица из 180 субъединиц, похожая на TBSV. Белок оболочки этого вируса также имеет S- и R-домены и соединительную «руку», но R-домен у него отсутствует. «Рука» и S-домен сложены и упакованы в вирионе практически так же, как в TBSV, причем обнаруживается заметная гомология их последовательностей. Оболочка STNV состоит лишь из 60 субъединиц. Каждая субъединица несет на N-конце короткую последовательность, которая располагается во внутренней области частицы, а остальная часть цепи укладывается в монодомен, похожий на S-домены TBSV и SBMV (хотя никакой гомологии последовательностей не наблюдается). Соединительная «рука» в данном случае отсутствует, поскольку в структурах с $T=3$ нет необходимости в перечислении положения, обеспечивающем правильную сборку. Кроме того, при упаковке в вирусную оболочку субъединица STNV располагается по отношению к своим соседям не совсем так, как S-домен в TBSV или SBMV. Эволюционные взаимоотношения между такими структурами пока не ясны. Один из вопросов, над которым сейчас усиленно размышляют исследователи, состоит в том, есть ли связь между этими сходными «РНК-упаковывающими» белками и нормальной клеточной «РНК-упаковывающей» структурой.

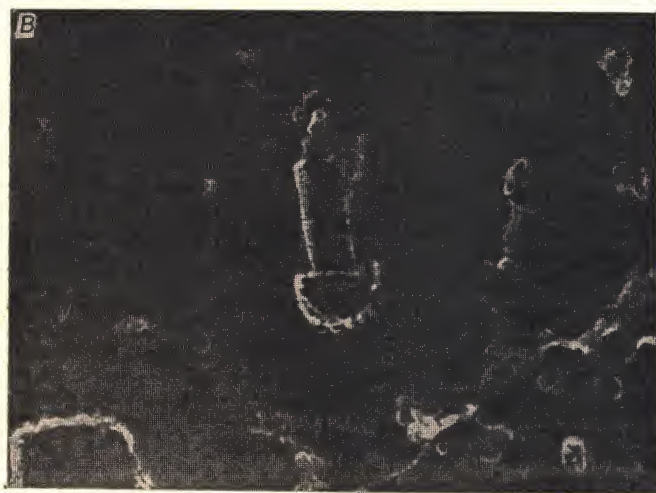
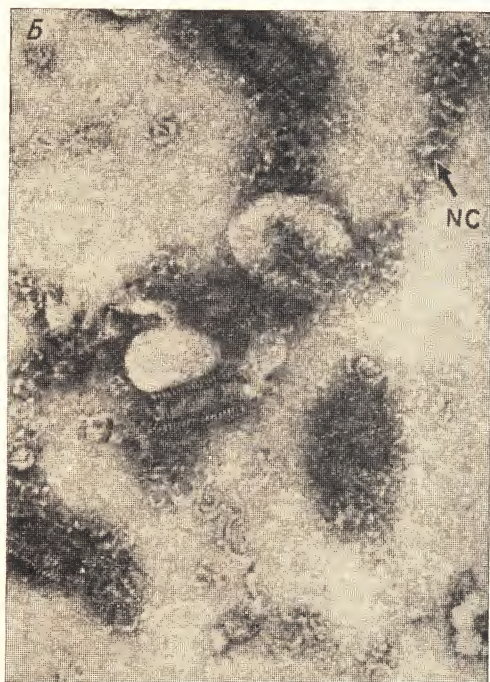
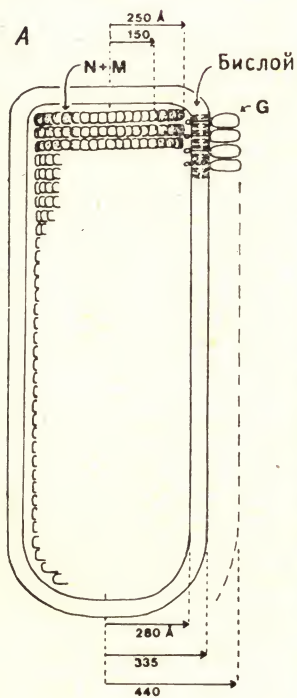
Полиовирусы и родственные вирусы

Это группа небольших РНК-содержащих вирусов, известных под названием «пикорнавирусы». Длина молекулы РНК составляет 6000 оснований, а диаметр целой частицы равен 280 Å. Конструкция этих вирусов, обладающих икосаэдрической симметрией, проще, чем у TBSV, поскольку она образована лишь 60 белковыми «структурными единицами». Каждая такая единица состоит из четырех полипептидных цепей (VP1, VP2, VP3 и VP4, где VP обозначает вирионный белок, от англ. virion protein). Эти цепи получаются после расщепления предшественника, причем по крайней мере часть расщеплений происходит после сборки интермедиатов. Таким образом, представление четырех цепей в виде единой структурной единицы — это не просто формальная процедура. Действительно, в некоторых частицах присутствует определенное количество нерасщепленных копий VP0 (VP2+VP4) [44, 46]. Удастся выделить пустые частицы, которые состоят из 60 единиц, каждая из которых содержит

цепи VP0, VP1 и VP3. Считается, что эти прокапсиды могут быть настоящими предшественниками вирионов [32], и для полной инкорпорации РНК нужно лишь, чтобы произошло расщепление $VP0 \rightarrow VP2 + VP4$. Необходимость таких стадий расщепления делает сборку полиовируса практически необратимым процессом. К 5'-концу РНК полиовируса присоединен пептид, обозначаемый VPg [39]. Этот пептид из 22 остатков образуется при расщеплении первичного продукта вирус-специфической трансляции [35]. Вероятно, он играет определенную роль в инициации репликации [43].

Вирус везикулярного стоматита (VSV)

Вирион вируса везикулярного стоматита содержит три главных белковых компонента (G, N и M), представленных в большом количестве, и два минорных (NS и L). Гликопротеин (G, 65K), нуклеокапсидный белок (N, 50K) и белок «матрикса» (M, 29K) находятся в молярном соотношении 1:2:3 или 1:2:4 [12]. Их организация показана на рис. 3.13, А. Общая форма частицы и взаимодействия между ее составляющими, вероятно, определяются компонентом М, который вместе с нуклеокапсидом образует трубчатые структуры. Эти структуры, по-видимому, представляют собой спираль «с мелкой нарезкой» и со следующими параметрами: 40 субъединиц на виток и 35 витков на всю частицу (рис. 3.13, Б), однако точная их архитектура пока неизвестна. Свободный нуклеокапсид, очевидно, представляет собой более плотно скрученную структуру, имеющую вид нитки бус, свернутой в спираль диаметром $\sim 150 \text{ \AA}$ (предположительно это N-субъединицы, связанные с РНК). Такую нитку, как бы выдавливаемую из частично разрушенного вириона (рис. 3.13, В), нередко удается увидеть под электронным микроскопом. Когда ее растягивают на углеродной пленке-подложке электронно-микроскопической сетки, она выглядит как синусоида, при этом локальный радиус кривизны равен радиусу спирали. Результаты некоторых опытов показывают, что N-белок связывается преимущественно с участком, расположенным на 5'-конце генома [5]. Гликопротеин (G) сообщается с внутренними структурами через липидный бислой при помощи гидрофобного «мембранного якоря» и малого внутреннего домена (гл. 4). Предполагают, что этот внутренний домен контактирует с М, но прямые доказательства на этот счет отсутствуют. Явление фенотипического смешивания и обнаружение псевдотипов (см. последующие главы) показывает, что, возможно, для взаимодействий между внутренними структурами и хвостовыми участками гликопротеинов характерна значительная свобода.



500 Å

Паповавирусы

Паповавирусы — самые мелкие из всех вирусов с двухцепочечной ДНК. Они содержат капсидные белки трех типов (VP1, VP2 и VP3) и комплексы замкнутой кольцевой ДНК с клеточными гистонами H2a, H2b, H3 и H4. Судя по электронным микрофотографиям (рис. 3.14, А), оболочка имеет 72 морфологические единицы («капсомеры») [37], которые организованы таким образом, что получается икосаэдрическая решетка с $T=7$. Конструирование икосаэдрических чехлов (см. выше) с химически квазиэквивалентными белковыми контактами показывает, что такая структура должна состоять из 420 субъединиц. Если же говорить о кластеризации типа «гексамер—пентамер», то это соответствует наличию 12 пентамерных кластеров и 60 гексамерных. Рентгеновские данные низкого разрешения и оценки молекулярной массы показывают, что полиомавирус (а также, по-видимому, другие представители этой группы вирусов) содержит 72 пентамера VP1, т. е. 360 копий, а не 420 [45]. Это означает, что для субъединицы VP1 в капсиде характерны шесть химически различающихся типов окружения (рис. 3.14, Б), а это противоречит принципу близкородственного специфического связывания. Однако в состав вирусных частиц входят также белки VP2 и VP3, и они могут формировать внутренний каркас вириона. Возможно, пентамеры VP1 представляют собой стабильные субансамбли, и взаимодействия субъединиц VP1 *внутри* пентамера на самом деле инвариантны. Если положение пентамеров в вирионе определяется белками VP2 или VP3, то взаимодействия между пентамерами могут немного варьировать, но сборка при этом будет правильной. Таким образом, структура паповавирусов — это пример наиболее простой конструкции, построенной по тому же принципу создания субансамблей, что и аденовирус (см. следующий раздел). О стабильности пентамера из VP1 свидетельствуют результаты анализа электронных микро-

Рис. 3.13. А. Структурная организация частицы VSV, иллюстрирующая связь между нуклеокапсидом (N), белком «матрикса» (M), гликопротеином (G) и липидным бислоем. Размеры получены на основании электронно-микроскопических данных [12] и данных по малоугловому рентгеновскому рассеянию (Wiley, неопубликованные данные). Б. Электронная микрофотография интактных и разрушенных частиц VSV. Трубочатые структуры, образованные белком M и нуклеокапсидом (NC), по-видимому, задают общую форму частицы (с любезного разрешения фон Бонсдорфа). В. Микрофотография частично разрушенного вириона VSV, полученная методом замораживания — травления. Видны структура сердцевины, выходящий из нее нуклеокапсид и разорванная мембрана. (С любезного разрешения Дж. Хезера.)

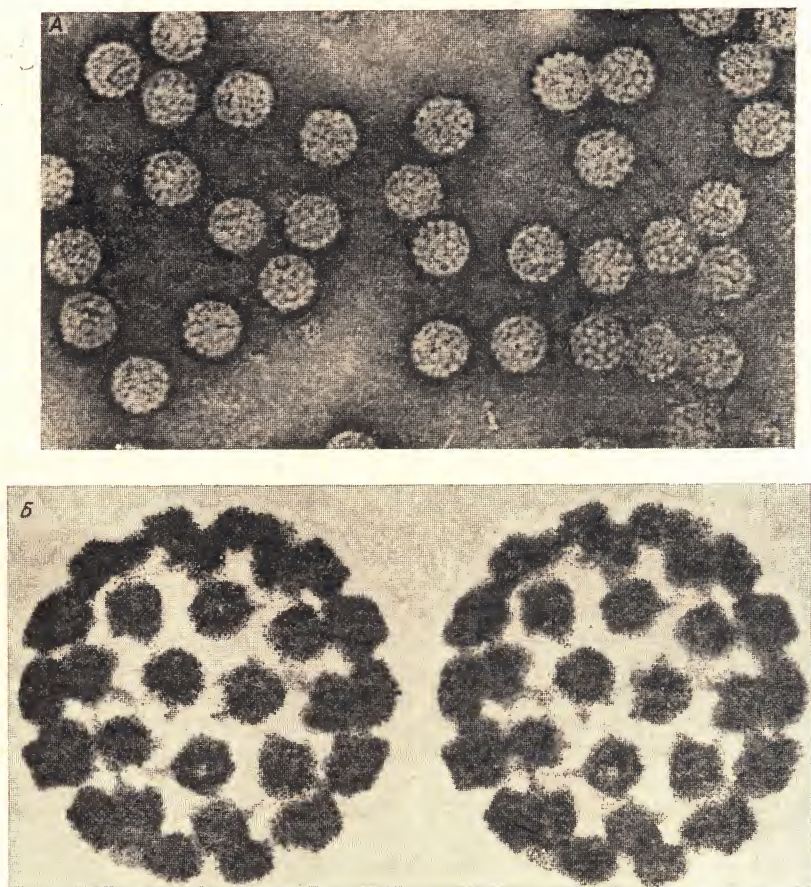


Рис. 3.14. А. Электронная микрофотография вируса полиомы (негативное контрастирование). Б. Стереопара, полученная с помощью трехмерной реконструкции аналогичных образцов (Finch, 1974). Все 72 морфологические единицы являются пентамерами белка VP1 (см. текст), хотя одни из них имеют шесть координаций, а другие пять. Диаметр вируса равен ~ 450 А. (С любезного разрешения Дж. Финча).

фотографий трубчатых структур, обнаруженных в неочищенном лизате клеток, которые были заражены вирусом полиомы. Некоторые из этих структур представляют собой уложенные в трубки пентамеры [2, 34]. Как и при анализе различных структур, образуемых белковыми субъединицами TMV (рис. 3.8), данный результат показывает, насколько полезно иметь представление о том, какие варианты или полиморфные формы молекулярных ансамблей возможны.

ДНК паповавирусов компактизуется вокруг гистонов, образуя типичную нуклеосомную структуру [23, 27]. Полное число нуклеосом, по-видимому, не фиксировано, и упаковка этой «мими-хромосомы» не определяется пространственной конфигурацией ДНК-гистоновых комплексов.

Аденовирусы

Аденовирусная частица имеет намного более сложную структуру, чем все описанные выше вирусы. Она наглядно демонстрирует, как собираются большие структуры из субансамблей. На рис. 3.15 изображен вирион аденовируса, а также подструктуры, из которых он состоит [22, 26]. Наружная оболочка обладает строгой икосаэдрической симметрией. На первый взгляд кажется, что она характеризуется триангуляционным числом $T=25$. Однако структуры в «пятикратных» позициях («пентоны») отличаются от остальных («гексонов»), а сами гексоны представляют собой не гексамеры, а тримеры. Таким образом, реальная структура вовсе не соответствует простому икосаэдру, полученному с помощью триангуляций.

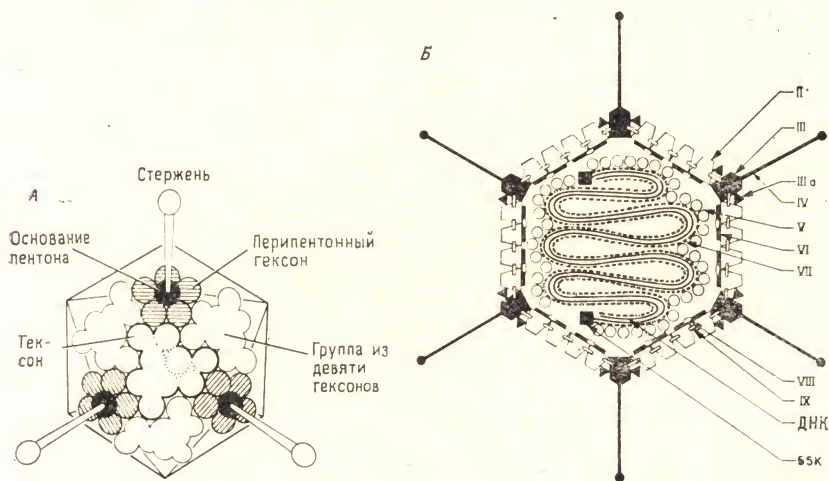


Рис. 3.15. А. Аденовирусная частица. Показана локализация основных белковых субструктур. Девять гексонов, изображенных в виде группы, и перипентонные гексоны представляют собой тримеры одинакового полипептида; единственное различие между этими гексонами состоит в их расположении в структуре частицы. (Иллюстрация Джона Мака; из [8], с разрешения автора.) Б. Поперечный разрез частицы. Показана предполагаемая локализация основных полипептидных компонентов и вирусной ДНК. Белки II, III и IV локализованы главным образом на основании исследований ступенчатой диссоциации частицы [26].

Гексоны и пентоны — это простейшие подструктуры. Гексоны — тримеры полипептида 110К (условно обозначаемого II). Они были закристаллизованы и сейчас почти завершено их рентгеноструктурное исследование с высоким разрешением [7]. Сборка гексонов из готовых белков *in vivo*, по-видимому, требует присутствия другого фактора — «белка 100К», который также закодирован в вирусном геноме и не входит в готовую вирусную структуру [17]. В вирионе с каждым гексоном связан белок VI. Пентоны состоят из двух полипептидов. Один из них (85К) образует основание, а другой (62К) — выступающий стержень (нить), видный на всех вершинах. Недавно было показано [20], что основание пентона, возможно, является тримером. В связи с этим возникает проблема подгонки типов симметрии, поскольку вершины «настроены» на пять соседей. Аналогичная проблема существует и при анализе других структур (например, хвостовой отросток бактериофага Т4 обладает симметрией 6-го порядка, и при этом присоединен к вершине головки, которая обладает симметрией 5-го порядка). Механизм подгонки на молекулярном уровне установить не удалось.

При диссоциации аденовирусной частицы с помощью различных методов (мягкой обработки трипсином, пиридином, дезоксихолатом, инкубацией при повышенной температуре и т. п.) образуются группы из девяти гексонов (рис. 3.15). Эти группы, выделенные из вирионов, содержат все гексоны, кроме перипентонных. По-видимому, группы удерживаются вместе белком IX, который при очистке выделяется вместе с ними. Фильтрация электронных микрофотографий девятичленных групп [19] показывает, что они, как и сами гексоны, обладают симметрией 3-го порядка. Каким образом взаимодействие с белком IX препятствует латеральной агрегации в этих структурах — пока неясно.

Сердцевина вириона аденовирусов содержит ДНК (~30 kb) и два основных белка (V и VII). Белок VII, богатый аргинином, представлен в количестве 1000 молекул на частицу и нейтрализует заряд примерно 50% фосфатных групп ДНК. Сердцевина достаточно компактна, но не содержит никаких четко выраженных подструктур [6].

Группы из девяти гексонов могут образовывать замкнутые структуры, похожие на вирусные капсиды, потерявшие пентоны и перипентонные гексоны [42]. Предполагают, что во время сборки вируса в ядре ДНК может упаковываться в такие «неупакованные» капсиды, однако пустых структур-предшественников обнаружено не было. Тем не менее сам факт образования капсидов из девятичленных групп показывает, что связывающие свойства этих комплексов, состоящих из белков II, VI и IX, могут обеспечить правильное угловое взаимодействие у грани икосаэдра и точное замыкание оболочки. Таким образом, группы из

девяти гексонов — это не какие-то случайные структуры, для них характерны важные белковые взаимодействия, однако интермедиатами процесса сборки они, по-видимому, не являются.

Проникновение вируса в клетку и его разборка

В этой главе основное внимание было уделено роли структурных факторов для специфичной и точной сборки вирусной частицы. Однако не менее важной ее функцией является проникновение в клетку и правильная разборка. Установлено, что ряд снабженных оболочкой вирусов обладает фузионной активностью. Эта активность опосредуется вирусным гликопротеином, вызывающим слияние вирусной мембраны с мембраной клетки. Структурные аспекты этого явления мы обсудим в следующей главе. Во многих случаях слияние активируется снижением pH, при этом сначала должен произойти захват путем рецепторного эндоцитоза [29]. Это обеспечивает переход внутренних структур, например нуклеокапсидов, в цитоплазму. Однако само по себе это не объясняет, почему такие структуры спонтанно собираются в процессе почкования и разбираются при заражении клетки. Проникновение в клетку и разборка структур, лишенных оболочки, таких, как вирус полиомиелита или аденовирус, еще более загадочны. По-видимому, аденовирусные частицы захватываются путем эндоцитоза и появляются сначала в клатриновых пузырьках, а затем в эндосомах, не имеющих клатринового слоя [24]. Впоследствии в цитоплазме можно обнаружить нераспавшиеся вирионы. Механизмы деления эндосомных мембран и инициации последующей разборки частицы пока неизвестны.

Литература

1. Abad-Zapatero C., Abdel-Miguid S. S., Johnson J. E., Leslie A. G. W., Rayment I., Rossmann M. G., Suck D., Tsukihara T. (1980). Structure of southern bean mosaic virus at 2.8 Å resolution, *Nature*, **286**, 33—39.
2. Baker T. S., Caspar D. L. D., Murakami W. T. (1983). Polyoma virus hexamer tubes consist of paired pentamers, *Nature*, **303**, 446—448.
3. Baltimore D. (1969). The replication of picornaviruses. In: *The Biochemistry of Viruses*, ed. by H. B. Levy, pp. 101—176, Marcel Dekker, New York.
- 3a. Bancroft J. E. (1970). The self-assembly of spherical plant viruses, *Adv. Virus Res.*, **16**, 99—134.
4. Bloomer A., Champness J. N., Bricogne G., Staden R., Klug A. (1978). Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits, *Nature*, **276**, 362—368.
5. Blumberg B. M., Giorgi C., Kolakofsky D. (1983). N protein of vesicular stomatitis virus selectively encapsidates leader RNA in vitro, *Cell*, **32**, 559—567.
6. Brown D. T., Westphal M., Burlingham B. T., Winterhoff U., Doerfler W. (1975). Structure and composition of the adenovirus type 2 core, *J. Virol.*, **16**, 366—387.
7. Burnett R. M. (1983). Structural investigations on hexon, the major coat

- protein of the adenovirus. In: *Biological Macromolecules and Assemblies*, Vol. I, Viral Structures, ed. by A. McPherson and F. A. Jurnak, pp. 337—385, Wiley, New York.
8. Burnett R. M. (1984). Structural investigations on hexon, the major coat protein of adenovirus. In: *The Viruses*, Vol. I, Biological Macromolecules and Assemblies, ed. by A. McPherson and F. A. Jurnak, pp. 337—385, Wiley, New York.
 9. Butler P. J. G., Durham A. C. H. (1977). Tobacco mosaic virus protein aggregation and the virus assembly, *Adv. Protein Chem.*, **31**, 187—251.
 10. Butler P. J. G., Klug A. (1971). Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disks of protein, *Nature [New Biol.]*, **229**, 47—50.
 11. Butler P. J. G., Finch J. T., Zimmermann D. (1977). Configuration of tobacco mosaic virus RNA during virus assembly, *Nature*, **265**, 217—219.
 12. Cartwright B., Smale C. J., Brown F., Hull R. (1972). Model for vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, **10**, 256—260.
 13. Casjens S. (1979). Molecular organization of the bacteriophage P22 coat protein shell, *J. Mol. Biol.*, **131**, 407—415.
 14. Casjens S., King J. (1975). Virus assembly, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 555—611.
 15. Caspar D. L. D. (1963). Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle, *Adv. Protein Chem.*, **18**, 37—121.
 16. Caspar D. L. D., Klug A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1—24.
 17. Cepko C. L., Sharp P. (1982). Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a nonviral protein, *Cell*, **31**, 407—415.
 18. Crick F. H. C., Watson J. D. (1956). Structure of small viruses, *Nature*, **177**, 473—475.
 19. Crowther R. A., Franklin R. M. (1972). The structure of the groups of nine hexons from adenovirus, *J. Mol. Biol.*, **68**, 18.
 20. Devaux C., Zulauf M., Boulanger R., Jacrot B. (1982). Molecular weight of adenovirus serotype 2 capsomers, *J. Mol. Biol.*, **156**, 927—939.
 21. Earnshaw W., Harrison S. C. (1977). DNA arrangement in isometric phage heads, *Nature*, **268**, 598—602.
 22. Everitt E., Lutter L., Phillipson L. (1975). Structural proteins of adenovirus. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation, and chemical cross-linking, *Virology*, **67**, 197—208.
 23. Fey G., Hirt B. (1975). Fingerprints of polyoma virus proteins and mouse histone, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 235.
 - 23a. Finch J. (1974). The surface structure of polyoma virus, *J. Gen. Virol.*, **24**, 359—364.
 24. Fitzgerald D. J. P., Padmanabhan R., Pastan I., Willingham M. C. (1983). Adenovirus-induced release of epidermal growth factor and pseudomonas toxin into the cytosol of KB cells during receptor-mediated endocytosis, *Cell*, **32**, 607—617.
 25. Fraenkel-Conrat H., Williams R. C. (1955). Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**, 690—698.
 26. Ginsberg H.-S. (1979). Adenovirus structural proteins. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 13, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 409—457, Plenum, New York.
 27. Griffith J. D. (1975). Chromatin structure: deduced from a minichromosome, *Science*, **187**, 1202.
 28. Harrison S. C., Olson A., Schutt C. E., Winkler F. K., Bricogne G. (1978). Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution, *Nature*, **276**, 368—373.
 29. Helenius A., Kartenbeck J., Simons K., Fries E. (1980). On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells, *J. Cell. Biol.*, **84**, 404—420.

30. Hogle J. (1982). Preliminary studies of crystals of poliovirus type 1. *J. Mol. Biol.*, **160**, 663.
31. Holmes K. C. (1980). Protein-RNA interactions during the assembly of tobacco mosaic virus, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 4—7.
32. Jacobson M. F., Baltimore D. (1968). Morphogenesis of poliovirus I. Association of the viral RNA with coat protein, *J. Mol. Biol.*, **33**, 369—378.
33. Jonard G., Richards K. E., Guillely H., Hirth L. (1977). Sequence from the assembly nucleation region of TMV RNA, *Cell*, **11**, 473—493.
34. Kiselev N. A., Klug A. (1969). The structure of viruses of the papilloma-polyoma type. V. Tubular variants built of pentamers, *J. Mol. Biol.*, **40**, 155—171.
35. Kitamura N., Adeer C. J., Rothberg P. G., Martinko J., Nathenson S. G., Wimmer E. (1980). The genome-linked protein of picornaviruses. VII. Genetic mapping of poliovirus VPg by protein and RNA sequence study, *Cell*, **21**, 295—302.
36. Klug A. (1979). The assembly of tobacco mosaic virus: structure and specificity, *Harvey Lect.*, **74**, 141—172.
37. Klug A., Finch J. T. (1965). Structure of viruses of the papilloma-polyoma type. I. Human wart virus, *J. Mol. Biol.*, **11**, 403—423.
38. Lebeurier G., Nicolaëff A., Richards K. E. (1977). Insideout model for self-assembly of tobacco mosaic virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 149—153.
39. Lee Y.-F., Nomoto A., Detjen B. M., Wimmer E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 59—63.
40. Lillias L., Unge T., Fridborg K., Jones T. A., Lovgren S., Skoglund O., Strandberg B. (1982). Structure of satellite tobacco necrosis virus at 3.0 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **159**, 93—108.
41. Munowitz M. G., Dobson C. M., Griffin R. G., Harrison S. C. (1980). On the rigidity of RNA in tomato bushy stunt virus, *J. Mol. Biol.*, **141**, 327—333.
42. Pereira H. G., Wrigley N. G. (1974). In vitro reconstitution, hexon bonding, and handedness of incomplete adenovirus capsid, *J. Mol. Biol.*, **85**, 617—631.
43. Petterson R. F., Ambros V., Baltimore D. (1978). Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA, *J. Virol.*, **27**, 357—365.
44. Putnak J. R., Phillips B. A. (1981). Picornaviral structure and assembly, *Microbiol. Rev.*, **45**, 287—315.
45. Rayment I., Baker T. S., Caspar D. L. D., Murakami W. T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution, *Nature*, **295**, 110—115.
- 45a. Robinson I. K., Harrison S. C. (1982). Structure of the expanded state of tomato bushy stunt virus, *Nature*, **297**, 563—568.
46. Rueckert R. R. (1976). On the structure and morphogenesis of picornaviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 6, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 131—200, Plenum Press, New York.
47. Stubbs G., Warren S., Holmes K. C. (1977). Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4-Å map calculated from x-ray fibre diagrams, *Nature*, **267**, 216—221.
48. Von Bonsdorff C. H., Harrison S. C. (1975). Sindbis virus glycoproteins form a regular icosahedral surface lattice, *J. Virol.*, **16**, 141—145.
49. Zimmer D. (1977). The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA, *Cell*, **11**, 463—482.

Оболочки вирусов

Дон Уайли¹

Архитектура и почкование вирусов, имеющих оболочку

Ряд вирусов животных приобретает липидсодержащую оболочку в процессе отпочковывания от мембраны клетки-хозяина. Используя клеточные механизмы компартментации, эти вирусы (см. разд. Белки вирусных оболочек) встраивают свои поверхностные гликопротеины в клеточную мембрану. Последующие события известны далеко не полностью, но есть данные, что при почковании осуществляется трансмембранное взаимодействие этих гликопротеинов с соответствующими компонентами вируса в цитоплазме и последующее отделение в составе вириона от клеточной поверхности [62]. Липиды образующегося бислоя имеют клеточное происхождение, а белки кодируются вирусом [22].

Характерные детали процесса почкования иллюстрирует рис. 4.1 [33]. В клетке-хозяине вирусная РНК и тесно связанный с ней нуклеопротеин (N) образуют нуклеокапсид вируса — рибонуклеопротеин (RNP). Структура нуклеокапсида зависит от типа вируса. У альфавирусов это компактная сферическая частица [52], у парамиксо- и рабдовирусов — нитчатая, спирализованная структура [18, 30], у миксовирусов — многосегментный спирализованный нуклеокапсид [88]. Один или два вирусных гликопротеина (гемагглютинин и нейраминидаза в случае вируса гриппа, изображенного на рисунке) закрепляются в клеточной мембране с помощью трансмембранного гидрофобного пептида, оканчивающегося небольшим цитоплазматическим доменом из 2—31 аминокислот. Белок матрикса (M) связывается с RNP и с внутренней поверхностью клеточной мембраны, взаимодействуя преимущественно с цитоплазматическими доменами гликопротеинов. При этом он может сначала либо образовать оболочку вокруг RNP, либо связаться с мембраной, а затем сконцентрировать RNP (рис. 4.1). Как видно из рисунка, процесс почкования регулируется специфическими взаимодействиями между поверхностными гликопротеинами и между гликопротеинами и

¹ Don C. Wiley, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138.

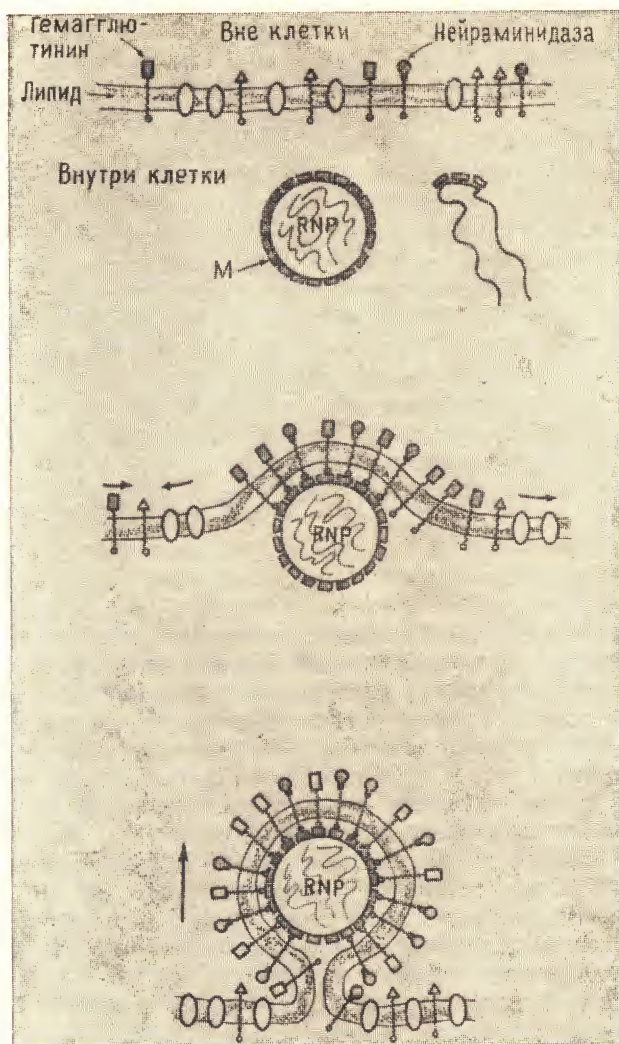


Рис. 4.1. Почкование вируса. Вирус-специфические гликопротеины встраиваются в клеточную мембрану с помощью клеточных механизмов компартментации. Почкование можно представить как трансмембранное распознавание нуклеокапсиды цитоплазматическим участком заякоривающего пептида гликопротеина. С помощью такого специфического трансмембранного распознавания и/или белок-белковых взаимодействий наружных участков гликопротеинов может регулироваться процесс «одевания» нуклеокапсиды вирусной оболочкой.

белком М. Исключения из этой схемы составляют: а) арбовирусы, не имеющие белка М, но содержащие белок сердцевинный (С), который обладает свойствами белков М и N; б) случаи фенотипического смешивания, когда, например, гликопротеины SV5 обнаруживаются в оболочке VSV [20].

В пользу данной схемы структурной организации вирусов с оболочкой говорит множество данных, а именно: 1. Протеолитическое расщепление [17, 24, 87] и опыты с химической меткой [91] свидетельствуют о наружном расположении гликопротеинов и внутреннем расположении М- и N-белков. 2. Опыты с использованием [^{35}S]-метионилсульфонметилсульфата, образование поперечных сшивок с помощью диметилсуберимидата и экстракция липидов с помощью детергента октилглюкозида в мягких условиях показывают, что гликопротеины вируса леса Семлики пронизывают липидную мембрану и контактируют с лежащим под ней белком [32, 43]. 3. Электронно-микроскопические исследования и данные малоуглового рентгеновского рассеяния подтверждают наличие липидного бислоя и расположение белков по обеим его сторонам [41, 106].

Вирусные оболочки

Оболочка вирусов принимает активное участие в следующих трех стадиях жизненного цикла вирусов: а) связываясь с клеточными рецепторами, мембранный гликопротеин обеспечивает присоединение вируса к клетке-мишени; б) фузионная активность вирусной оболочки инициирует инфекцию, вызывая слияние оболочки вируса с клеточной мембраной и перенос нуклеокапсида в клетку-мишень; в) почкование вируса обеспечивает высвобождение вирусных частиц из инфицированных клеток без лизиса последних. Кроме того, поскольку вирусные гликопротеины располагаются на наружной поверхности вирусной частицы, именно на них реагирует иммунная система и именно они являются субстратом для создания противовирусных вакцин. Далее в этой главе мы рассмотрим структуру вирусных оболочек под таким углом зрения, который позволил бы нам понять, как они обеспечивают взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином.

Оболочка вируса Синдбис

При электронно-микроскопическом исследовании вирусов является поверхностный слой «шипов» — гликопротеиновых структур, выступающих из липидного бислоя. В некоторых случаях их расположение упорядочено, но многие вирусные препараты либо полиморфны, либо повреждаются в процессе приготовления, что затрудняет выявление возможных упорядоченных

структур. Четкую поверхностную решетку имеют альфавирусы [вирус Синдбис и вирус леса Семлики (SFV)], буньявирус (УукуниEMI) и один из миксовирусов (вирус гриппа С).

Вирион вируса Синдбис — это сферическая частица диаметром примерно 700 Å; она содержит одноцепочечную РНК с мол. массой $4 \cdot 10^6$; внутренний белок С (мол. масса 29 000); два мембранных гликопротеина Е1 и Е2 (с мол. массой соответственно 49 000 и 47 000). Белки С, Е1 и Е2 присутствуют в эквимольных количествах; они образуются при трансляции одной мРНК и посттрансляционном расщеплении полипротеина. С помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния и электронной микроскопии были выявлены изометрические очень правильные частицы с радиусом липидного слоя 210—260 Å и наружным радиусом 350 Å [41, 106]. Электронно-микроскопические исследования негативно контрастированных частиц и препаратов, полученных методом замораживания—травления, показывают, что поверхностные гликопротеины вируса Синдбис образуют регулярную поверхностную решетку (рис. 4.2) [106]; она сформирована выступами из димеров Е1/Е2.

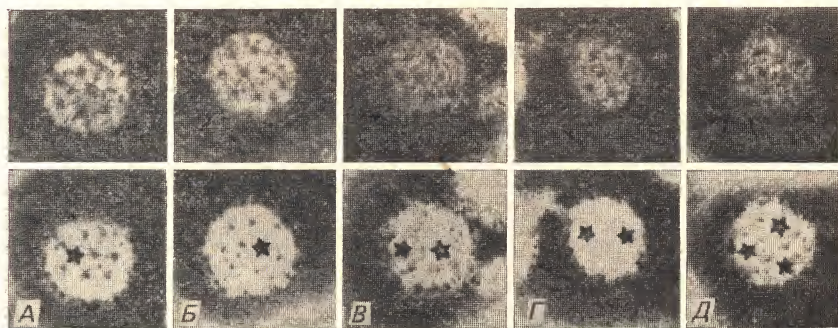


Рис. 4.2. Поверхность вируса Синдбис [106]. Отдельные окрашенные фосфовольфрамовой кислотой частицы показаны дважды; на нижних фотографиях звездочками помечены выступы на поверхностной икосаэдрической решетке, через которые проходят оси симметрии 5-го порядка.

Нуклеокапсид вируса леса Семлики, очень сходного с вирусом Синдбис, также имеет икосаэдрическую форму, однако его детальная структура не установлена [52, 75]. Взаимодействие между цитоплазматическими доменами гликопротеинов, образующими выступы, и нуклеокапсидом, а также эквимольное соотношение между гликопротеинами и вирусным белком сердцевинны свидетельствуют о том, что нуклеокапсид имеет икосаэдрическую поверхностную решетку. Это в свою очередь пред-

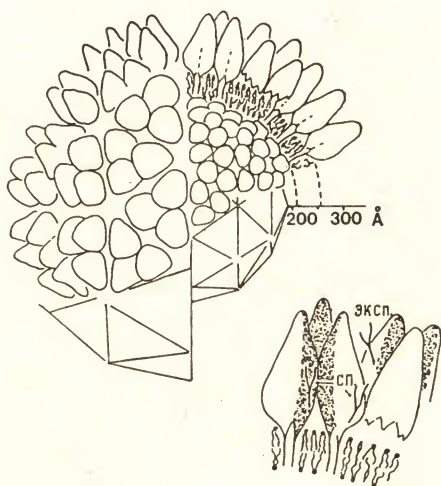


Рис. 4.3. Наилучшая из имеющихся в настоящее время моделей вируса Синдбис [40]. Каждая структурная единица на поверхности представлена субъединицами Е, Е1 и Е2. Как Е1, так и Е2 имеют гидрофобный якорь, проходящий через липидный бислой. У Е1 с внутренней стороны мембраны находится только дипептид Arg-Arg, а у Е2 — пептид из 33 остатков, которые, вероятно, контактируют с сердцевинной вирусной частицей. Детальная организация субъединиц на поверхности сердцевины неизвестна. На схеме внизу справа показано расположение спрятанных внутри структуры (сп.) и экспонированных (эксп.) олигосахаридов.

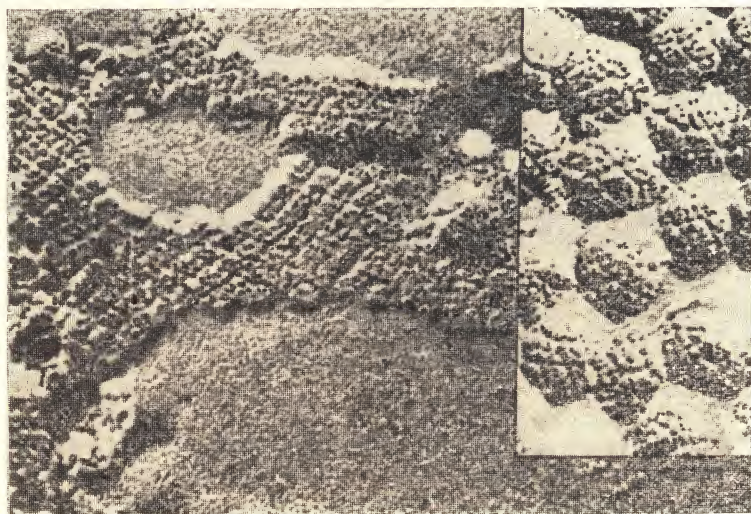


Рис. 4.4. Микрофотография поверхности вируса Синдбис, полученная после мягкой обработки препарата детергентом [107]. Использован метод замораживания — травления. *Справа* — выявленный с помощью детергента бислой в увеличенном виде; видна гексагональная упаковка гликопротеинов. Их расположение в бислойе сходно с таковым в самой вирусной мембране.

полагает наличие очень простого механизма почкования, в основе которого лежит ассоциация нуклеокапсидов с гликопротеинами в результате распознавания их трансмембранного цитоплазматического домена. На рис. 4.3 схематически изображена оболочка вируса Синдбис.

Постепенная детергентная солюбилизация вируса Синдбис (разд. «Выделение и гидрофобные свойства вирусных гликопротеинов») приводит к разделению вирусной оболочки на «листки». Эти листки, содержащие гликопротеины, могут соединяться и образовывать гексагональные структуры, в которых расположены гликопротеины сходно с таковым в вирусной частице (рис. 4.4) [107]. Формирование структур, сходных с вирусными, свидетельствует о наличии сильных специфических гликопротеин-гликопротеиновых связей. Именно образование этих нековалентных связей наряду со специфическим распознаванием нуклеокапсидом участка закоривания, вероятно, играет важную роль в регуляции процесса почкования.

Однородность популяции этих вирусов и регулярность их поверхностной структуры подтверждаются наблюдаемой иногда кристаллизацией SFV (рис. 4.5) [126]. Формирование трехмерных кристаллов предполагает наличие у вируса упорядоченной поверхностной структуры, способной к образованию повторяющихся специфических контактов, необходимых для кристаллизации.

Оболочка вируса Укуниими

Геном буньявируса Укуниими состоит из трех одноцепочечных сегментов РНК и ассоциирован с белком нуклеокапсида (мол. масса 25 000). Мембрана содержит один гликопротеин. По данным электронной микроскопии вирус, по-видимому, созревает путем почкования в гладкие везикулы аппарата Гольджи, хотя анализ вирусных липидов указывает на их сходство с липидами плазматической мембраны. При электронно-микроскопических исследованиях негативно контрастированных частиц и препаратов, полученных методом замораживания — травления, выявляются высокоупорядоченные поверхностные структуры (рис. 4.6).

Анализ взаимосвязи между морфологическими единицами на поверхности оболочки показывает, что эти единицы образуют поверхностную решетку с $T=12$ ($P=3$) [108]. Разрушение этой решетки с помощью протеолитических ферментов приводит к появлению сильно деформированных, лишенных выступов частиц, что свидетельствует об участии поверхностных гликопротеинов в стабилизации вириона.

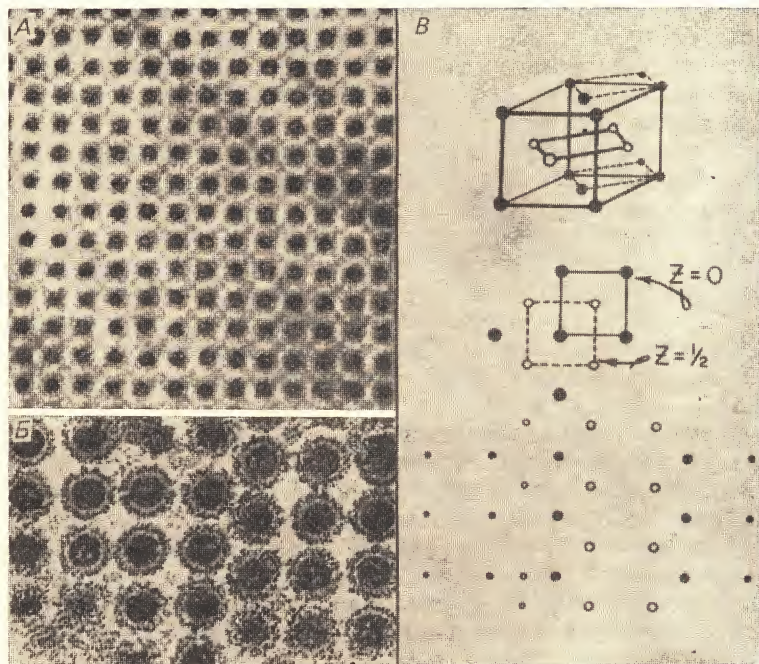


Рис. 4.5. Электронная микрофотография тонкого среза, проходящего через кристалл SFV, вдоль оси 2-го порядка (100) [126]. А. Плоскость среза проходит через центр частиц. Б. Наклонный срез через два последовательных слоя частиц, плотно упакованных в кубической решетке. Обратите внимание, что последующий слой сдвинут по отношению к предыдущему на $\frac{1}{2}$ периода решетки. В. Схематическое изображение кубической плотно упакованной структуры, на котором представлены плоскости (100) (вверху) и смещение последовательных слоев на $\frac{1}{2}$ периода ячейки (сплошные и открытые кружки). Анализ кристаллов SFV показывает, что препараты содержат гомогенные частицы, окруженные липидными мембранами с регулярной поверхностной структурой, обеспечивающей образование специфических контактов, необходимых для кристаллизации.

Оболочки вируса гриппа С

При электронно-микроскопическом исследовании оболочек вирусов, более крупных и сложных, чем вирус Синдбис, SFV и вирус Укуниими, в большинстве случаев не обнаруживается четко упорядоченной поверхностной структуры. Однако вирус гриппа С обладает правильной, открытой гексагональной структурой, образуемой поверхностными гликопротеинами [49, 119] (рис. 4.7). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что этот вирус содержит только один гликопротеин — гемагглютинин, а

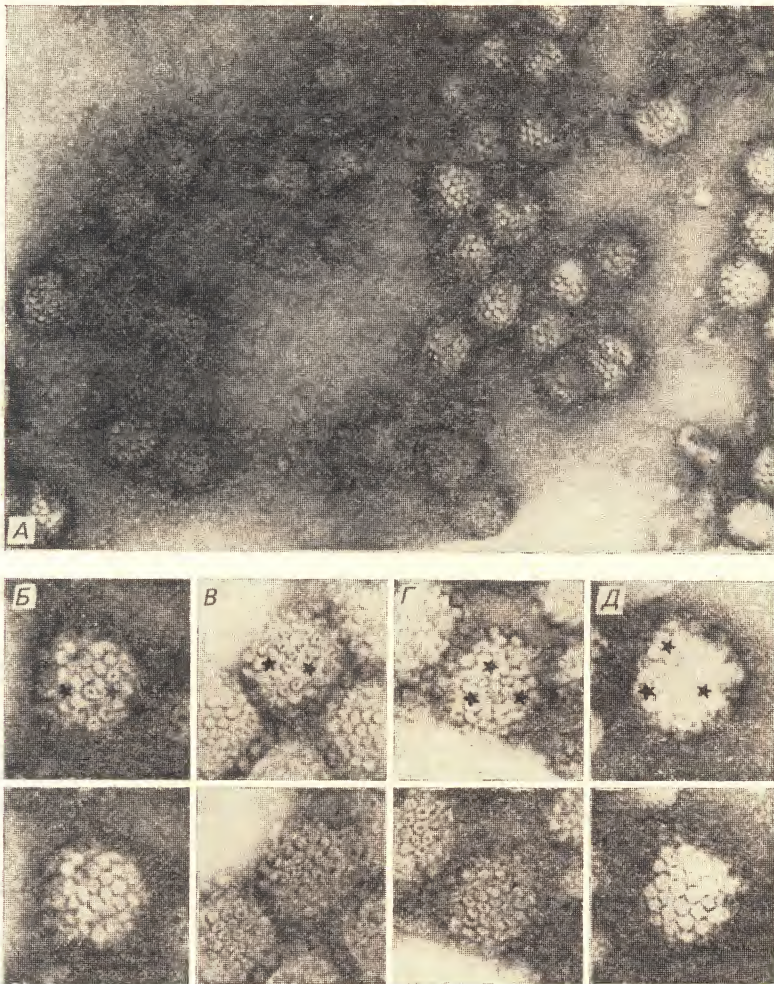


Рис. 4.6. Частицы вируса Уукуниими, фиксированные перед очисткой глутаральдегидом и негативно окрашенные уранилацетатом [108]. Вверху — слегка уплощенные частицы с четко различимой поверхностной структурой. Внизу — отдельные частицы с гексагональной укладкой субъединиц; положение пентамеров отмечено звездочками. У всех представленных частиц расположение гликопротеинов соответствует икосаэдрической поверхностной решетке с $T=12$.

нейраминидаза, присутствующая у вирусов гриппа А и В, у него отсутствует [119]. Возможно, это и обуславливает столь высокую упорядоченность оболочки вируса гриппа С.

Все ли вирусы животных с оболочкой имеют гликопротеины,

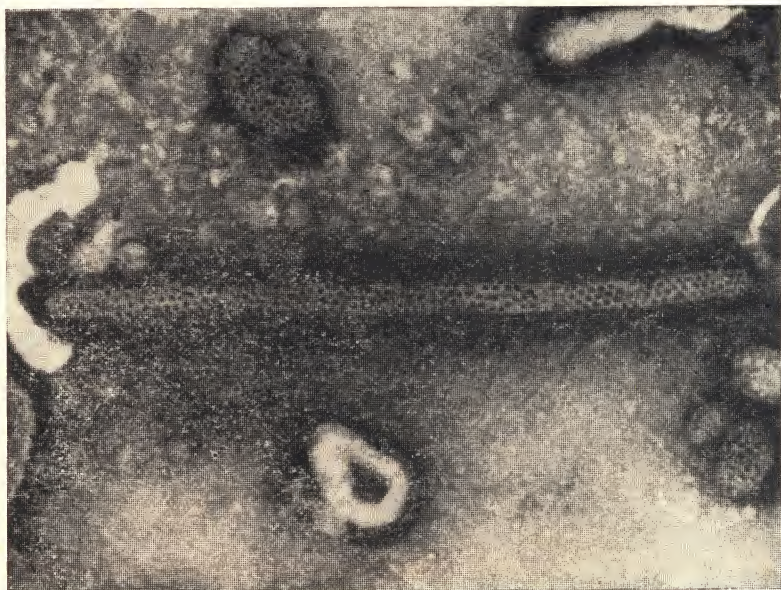


Рис. 4.7. Гликопротеины вируса гриппа С расположены так, что они образуют гексагональную поверхностную решетку. Показаны трубчатые и сферические полиморфные формы. (Микрофотография представлена Р. Компансом.)

образующие упорядоченные поверхностные решетки, — неизвестно. Данные, указывающие на использование повторяющихся специфических контактов при сборке, суммированы в этой главе и в гл. 3.

Белки вирусных оболочек

Белки оболочек: введение

Биосинтез

Белки, секретируемые через мембраны, а также многие интегральные белки (в том числе все вирусные гликопротеины) синтезируются на связанных с мембранами полирибосомах [см. обзор 56]). Все эти белки имеют N-концевой пептид, называемый сигнальным пептидом или «лидерной» последовательностью [71]. Этот пептид ответствен за перенос синтезируемой полипептидной цепи через мембрану в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭР) [71]. Аминокислотные последовательности сигнального пептида нескольких вирусных гликопротеинов пред-

	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
HEMAGGLUTININ																			
A/AICHI/68																			
A/WSN/33																			
A/PR/8/34																			
A/RI/5-/57																			
A/JAP/305/57																			
A/VIC/3/75																			
A/FPV/RCS/34																			
A/60/68																			
A/MEM/1/71																			
A/MEM/102/72																			
A/MEM/10/78																			

VSV																			
RABIES																			

Рис. 4.8. Аминокислотные последовательности сигнальных пептидов вирусных гликопротеинов [1, 2, 5, 13, 34, 50, 72, 76, 82, 95, 105, 130]. Все они имеют центральный участок, состоящий в основном из гидрофобных остатков, который на N-конце часто бывает ограничен положительно заряженными остатками. Аминокислотные последовательности представленных сигнальных пептидов при образовании зрелого белка отщепляются с C-конца по позиции —1, 11 верхних последовательностей относятся к гемагглютиниону вируса гриппа, а две нижних — к белку G вируса ветряночного стоматита и вируса бешенства.

ставлены на рис. 4.8. Все последовательности имеют центральный участок из незаряженных, в основном гидрофобных аминокислот, часто ограниченный с N-конца положительно заряженным остатком. По-видимому, никакие другие специфические последовательности, кроме этих незаряженных, в основном гидрофобных участков протяженностью по крайней мере 11 аминокислот, не нужны.

Необходимое пространственное распределение секреторных и мембранных белков в клетке обеспечивается с помощью какого-то сложного механизма. Клеточные «распознающие сигнал» (РСЧ), которые содержат шесть белков и 7S-РНК, связываются со свободными рибосомами, несущими новосинтезированные сигнальные последовательности, и останавливают трансляцию мембранных или секреторных белков. Трансляция возобновляется лишь после связывания комплекса рибосома—РСЧ с мембраной ЭР. Затем белок, несущий сигнальный пептид, перемещается через мембрану [70, 110—114]. Секреторные белки высвобождаются в полость цистерны ЭР, а мембранные белки остаются связанными с мембраной через гидрофобные участки своей полипептидной цепи (разд. «Первичная структура вирусных гликопротеинов»). Обычно сигнальный пептид отщепляется от новосинтезированного белка «сигнальной пептидазой» во время переноса через мембрану [133].

В просвете грубого ЭР одновременно с процессом контрансляционного переноса к образующемуся гликопротеину присоединяются олигосахаридные цепи [54]. В большинстве вирусных

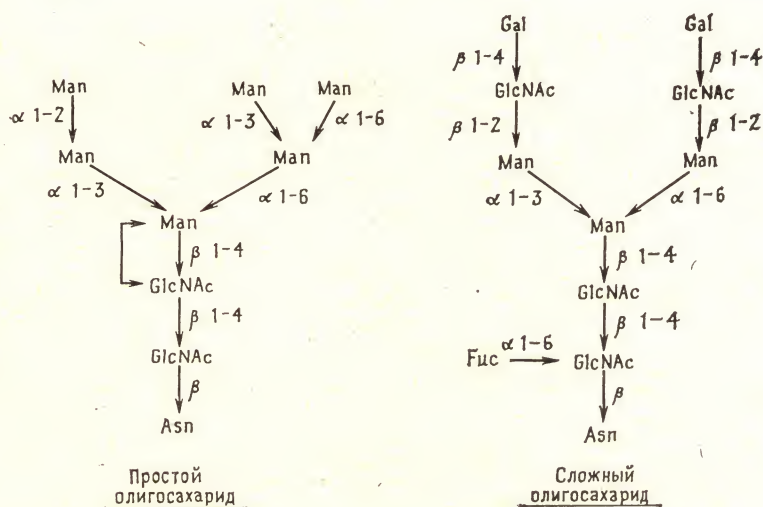


Рис. 4.9. Простые и сложные олигосахариды, присоединяющиеся к гликопротеинам через атом азота. Простые олигосахариды, состоящие из N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и маннозы (Man), целиком переносятся на последовательности Asn-X-Ser/Thr. Ферменты, с помощью которых осуществляется процессинг углеводов в гладком ЭР, отщепляют остатки маннозы и присоединяют фукозу, N-ацетилглюкозамин, галактозу и нейрамининовую кислоту. Некоторые вирусы содержат нейраминидазу, отщепляющую концевую нейраминовою кислоту, в результате чего образуется олигосахарид, аналогичный представленным на этом рисунке.

мембранных гликопротеинов простые богатые маннозой олигосахариды целиком переносятся с липидного предшественника (долихола) с образованием N-гликозидной связи с аспарагином в последовательностях Asn-X-Ser/Thr [67, 109]. Фракционирование клеток и электронно-микроскопические исследования показывают, что на пути к клеточной поверхности вирусные гликопротеины переходят из ЭР в комплекс Гольджи [37, 42, 55, 102]. Многие (но не все) простые олигосахариды при этом подвергаются процессингу маннозилгликозидазами, удаляющими маннозные остатки, и гликозилтрансферазами, присоединяющими галактозу, фукозу, N-ацетилглюкозамин и нейрамининовую кислоту (рис. 4.9) [61].

Путь, по которому гликопротеин, подвергшийся процессингу, перемещается к поверхности клетки, не совсем ясен. Некоторые эпителиальные клетки образуют монослои, в которых плотные контакты делят плазматическую мембрану на два участка: апикальную и базолатеральную поверхности. Некоторые вирусы с оболочкой отпочковываются только от одной из поверхностей. Например, сборка вирусов гриппа и парагриппа осуществляется

на апикальной поверхности, а вируса везикулярного стоматита — только на базолатеральной [79, 83]. Ни механизм этого явления, ни участок молекулы (наружная часть гликопротеина, трансмембранный пептид или цитоплазматический домен), существенный для этого процесса, неизвестны.

Структурные классы

Мембранные гликопротеины подразделяются на два структурных класса. Первый включает вирусные гликопротеины, присоединенные к липидному бислою только трансмембранным заякоривающим пептидом. Большая часть молекулы таких гликопротеинов находится на наружной поверхности мембраны, и лишь небольшой домен — со стороны цитоплазмы. В противоположность этому у гликопротеинов второго структурного класса, образующих транспортные «насосы» и каналы в мембранах, в липидный бислой погружен большой домен. У одного из бактериальных белков — родопсина — трансмембранный домен содержит семь α -спиралей, несколько раз пересекающих липидный бислой в двух направлениях [48].

В вирусных гликопротеинах трансмембранный заякоривающий пептид содержит 20—27 незаряженных, в основном гидрофобных аминокислотных остатков (разд. «Первичная структура вирусных гликопротеинов»). Это характерно для гликопротеинов первого класса, куда кроме вирусных белков входят антигены гистосовместимости HLA и H2, эритроцитарный гликофорин и связанный с мембранами IgM [81, 97, 103]. Вероятно, у всех этих молекул гидрофобный участок якоря образует α -спираль, которая проходит через липидный бислой. В пользу этого говорят две важные особенности α -спирали. Во-первых, участок аминокислот 20—27 в α -спиральной конформации имеет достаточную протяженность для того, чтобы пересечь бислой. Во-вторых, α -спираль — такая структура, при которой в единичной цепи образуются все возможные внутренние водородные связи с участием атомов кислорода карбонильных групп и атомов азота амидных групп; в результате в липидный бислой, т. е. в гидрофобное окружение, пептидная цепь не будет вносить полярных атомов, заряд которых не был бы нейтрализован.

Выделение и гидрофобные свойства вирусных гликопротеинов

Вирусные мембранные гликопротеины можно выделить в интактном виде из липидного бислоя только путем сольubilизации мембран с помощью детергента. На первом этапе этого процесса связывание детергента приводит к разрыву мембран и высвобождению нуклеокапсида [45]. Последующие этапы сольу-

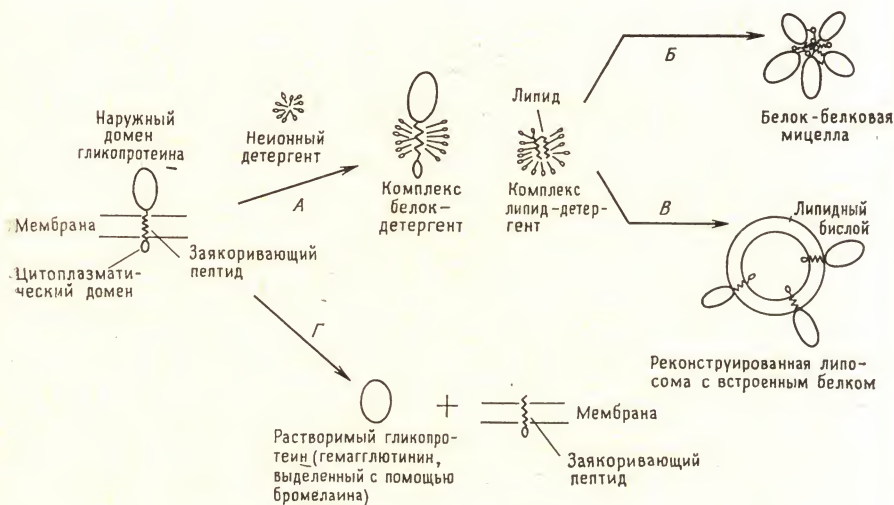


Рис. 4.10. Выделение мембранных белков. А. Неионный детергент, присутствующий в избытке, растворяет мембранные белки, связываясь с гидрофобными (волнистая линия) участками белков и липидов. Б. После удаления детергента в отсутствие липидов образуются белок-белковые мицеллы, формирующиеся благодаря взаимодействию гидрофобных якорных пептидов. В. После удаления детергента в присутствии липидов происходят восстановление липидных бислойных пузырьков и встраивание белков в искусственную мембрану. Г. В некоторых случаях при обработке мембранных белков протеазами отщепляется гидрофобный якорный пептид вблизи поверхности мембраны, освобождая растворимый активный фрагмент гликопротеина. (На рисунке приведен пример выделения геммагглютинаина вируса гриппа с помощью бромелаина.)

билизации представлены на рис. 4.10. Неионные детергенты солибилизируют мембранные белки, связываясь с гидрофобной частью белков и липидов. При избытке детергента каждая молекула белка и липида оказывается включенной в отдельную мицеллу детергента. После удаления липидов остается монодисперсный раствор комплекса белок—детергент. Поскольку большинство неионных детергентов не денатурируют белки, эти комплексы стабильны и функционально активны [46]. Если детергент удалить в отсутствие липидов, то гидрофобная якорная часть гликопротеина агрегирует и образует белок-белковую мицеллу (рис. 4.10, Б). Если детергент удалить в присутствии липидов, то образуются бислойные липидные везикулы с включенными в них гликопротеинами (рис. 4.10, В). Таким образом, в водной фазе никогда не обнаруживается гидрофобная заякоривающая пептидная часть гликопротеинов; она всегда находится либо в гидрофобном липидном бислое, либо окружена гидрофобными участками молекул детергента. На рис. 4.11 представ-

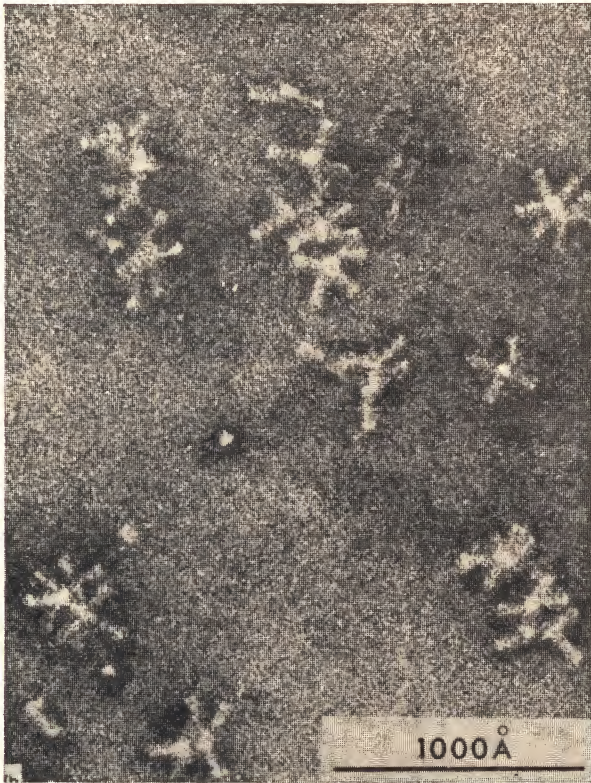


Рис. 4.11. Белок-белковые мицеллы гемагглютини́на вируса гриппа, полученные после удаления детергента из очищенного препарата белка [59].

лена электронная микрофотография белок-белковых мицелл гемагглютини́на вируса гриппа, полученных после удаления детергента из монодисперсного раствора белок-детергентных комплексов [59]. Благодаря своей звездчатой структуре белок-белковые мицеллы вирусных гликопротеинов оказываются весьма полезными при получении вакцин и широко используются в биохимических исследованиях [8, 14, 47].

Для исследования наружного гидрофильного домена мембранных белков в ряде случаев можно удалить закоривающий пептид путем протеолитического расщепления мембран или белково-детергентных комплексов (рис. 4.10, Г) [15, 21, 39, 97, 100]. При этом нередко гидрофильная часть молекулы высвобождается в виде не только растворимого, но и активного белка. Поскольку разные участки вирусного гликопротеина находятся в

	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
A/AICHI/68	TRP	ILE	LEU	TRP	ILE	SER	PHE	ALA	ILE	SER	CYS	PHE	LEU	LEU	CYS	VAL	VAL	LEU	LEU	GLY	PHE	ILE	MET	TRP	ALA	CYS	GLN
A/DUCK/UGR/63																											
A/NT/60/68																											
A/MSV/102/72																											
A/NTC/3/75																											
A/FR/8/34	GLN		ALA		TYR	SER	THR	VAL	ALA	SER	SER		VAL	LEU	LEU		SER		ALA	ILE	SER	PHE		MET	SER	GLY	
A/JAP/305/57	GLN		ALA		TYR	ALA	THR	VAL	ALA	GLY	SER		SER	LEU	SER	ILE	MET	MET		ILE	SER	PHE		MET	SER	ALA	
A/WSV/33	GLN		ALA		TYR	SER	THR	VAL	ALA	SER	SER		VAL	LEU	LEU		SER		ALA	ILE	SER	PHE		MET	SER	GLY	
A/PAF/KS/34	VAL		PHE					GLY	ALA				VAL	LEU	ALA	ILE	ALA		VAL	LEU	VAL						
B/LEU/40	—				LEU	TYR	TYR	SER	THR	ALA	SER	SER		ALA	VAL	THR	LEU	MET	ILE	ILE		VAL	TYR	MET	VAL	SER	
B/MD/59	—				LEU	TYR	TYR	SER	THR	ALA	SER	SER		ALA	VAL	THR	LEU	MET	ILE	ILE		VAL	TYR	MET	VAL	SER	
B/HK/8/73	—				LEU	TYR	TYR	SER	THR	ALA	SER	SER		ALA	VAL	THR	LEU	MET	ILE	ILE		VAL	TYR	MET	VAL	SER	
VSV	SER	SER	ILE	ALA	SER	PHE	PHE	PHE	ILE	ILE	ILE	GLY	LEU	ILE	ILE	GLY	LEU	PHE	LEU	VAL	LEU						
RABIES	TYR	VAL	LEU	LEU	SER	ALA	GLY	ALA	LEU	THR	ALA	LEU	SER	LEU	ILE	ILE	PHE	LEU	MET	THR	CYS	CYS					
SFV/E2	ALA	ALA	THR	VAL	SER	ALA	VAL	VAL	GLY	MET	SER	LEU	LEU	ALA	LEU	ILE	PHE	ALA	SER	CYS	TRP	MET	LEU	VAL	ALA	ALA	
SFV/E1	ILE	SER	GLY	GLY	LEU	GLY	ALA	PHE	ALA	ILE	GLY	ALA	ILE	LEU	VAL	LEU	VAL	VAL	THR	CYS	ILE	GLY	LEU				
SINDBIS E2	PRO	VAL	TYR	THR	ILE	LEU	ALA	VAL	ALA	SER	ALA	THR	VAL	ALA	MET	MET	ILE	GLY	VAL	THR	VAL	ALA	VAL	CYS			
SINDBIS E1	LEU	PHE	ALA	LEU	PHE	GLY	GLY	ALA	SER	SER	LEU	LEU	ILE	ILE	GLY	LEU	MET	ILE	PHE	ALA	CYS	SER	MET	MET	LEU	THR	THR

Рис. 4.13. Аминокислотные последовательности гидрофобного закрывающего пептида [5, 13, 28, 33, 36, 50, 57, 58, 72, 76, 77, 82, 95, 105, 115, 130]. Незаряженные, в основном гидрофобные, участки у С-конца вирусных гликопротеинов пронизывают вирусную мембрану. Представлены последовательности закрывающих пептидов девяти геммагглютининов вируса гриппа А и трех — вируса гриппа В; нумерация такая же, как у HA Aichi 1968. Для вирусов бешенства, VSV, вируса леса Семлики и вирусов Синдбис (E1 и E2) нумерация аминокислотных остатков не указана. Черточками обозначены делеции, а галочками — вставки.

шью в бислое [29]. Несколько гидрофобных сегментов закрывающих пептидов представлены на рис. 4.13. Для формирования трансмембранного «якоря» не требуется наличие специфических аминокислотных последовательностей; необходимо только, чтобы имелся достаточно протяженный участок незаряженных, в основном гидрофобных аминокислот. В таких участках часто встречаются две полярные аминокислоты: серин и треонин. Указанные положения не расходятся с нашим представлением об α -спиральной структуре этих участков (разд. «Структурные классы»), поскольку гидроксильные группы серина и треонина, как известно из рентгеноструктурного анализа растворимых белков, могут образовывать водородные связи с атомами азота амидных групп главной цепи в α -спирали. Есть данные о том, что к этим гидроксильным группам присоединены жирные кислоты, но биологическая роль этого явления пока неясна [86].

За гидрофобным сегментом на С-концевом закрывающем участке имеется небольшой гидрофильный домен, расположенный с внутренней стороны мембраны. Длина этого домена варьирует от дипептида Arg-Arg у E1 SFV до 31 аминокислоты у E2 SFV [33]. Вероятно, подобные домены, как это уже обсуждалось, участвуют в процессе почкования вируса.

Области прикрепления олигосахаридов, сайты посттрансляционного расщепления и специальные последовательности, участвующие в слиянии мембран, указаны на рис. 4.12 и обсуждаются в последующих разделах.

Трехмерная структура вирусных гликопротеинов

Трехмерная структура наружной части обоих мембранных гликопротеинов вируса гриппа установлена с помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения. В следующих двух разделах вкратце описана архитектура молекул гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА) вируса гриппа; при этом особое внимание уделено областям, имеющим биологическую активность.

Гемагглютинин вируса гриппа

Гемагглютинин вируса гриппа штамма Aichi/68, выделенного в 1968 г., синтезируется как единая полипептидная цепь, состоящая из 550 аминокислот. В результате последующего расщепления с удалением остатка Arg-329 образуются две цепи, НА1 и НА2, ковалентно связанные дисульфидной связью между позициями 14 в НА1 и 137 в НА2 (рис. 4.12) [115]. Эти двухцепочечные мономеры объединяются с помощью нековалентных связей в тримеры и располагаются на поверхности мембран [127]. При обработке вируса бромелаином получают растворимые тримеры внеклеточных участков гемагглютинина, содержащие целый НА1 и первые 174 из 221 аминокислотных остатков НА2 (рис. 4.12) [15]. Таким образом, бромелаин удаляет закоривающий пептид. Пространственная структура этого тримера установлена с помощью рентгеноструктурного анализа [129].

На рис. 4.14, А схематически изображен мономер гемагглютинина. Та часть молекулы, которая обращена к мембране (это N-конец НА1 и С-конец НА2), находится в нижней части рисунка; вертикальная стрелка представляет собой ось симметрии 3-го порядка в тримере. Мономер — это протяженная структура, выступающая из мембраны на 135 Å. Она содержит стволовой участок и глобулярную структуру на вершине. Эта структура образована частью цепи НА1, а «ствол» содержит часть цепи НА1 и всю цепь НА2. Полипептид имеет необычайно растянутую конформацию. Прежде чем образовать первую компактную складку, 63 N-концевые аминокислоты вытягиваются вверх от мембраны на 96 Å. Глобула на вершине содержит β-слой из восьми антипараллельных цепей. Этот домен формирует участок связывания с сialовой кислотой, являющейся необходимой составной частью клеточного рецептора вируса гриппа (см. разд. «Связывание с рецептором»). Остальная часть НА1 возвращается к «стволу» и идет почти антипараллельно начальному отрезку НА1.

N-конец НА2 и С-конец НА1 разделены расстоянием 22 Å. Это свидетельствует о том, что расщепление на две полипептид-

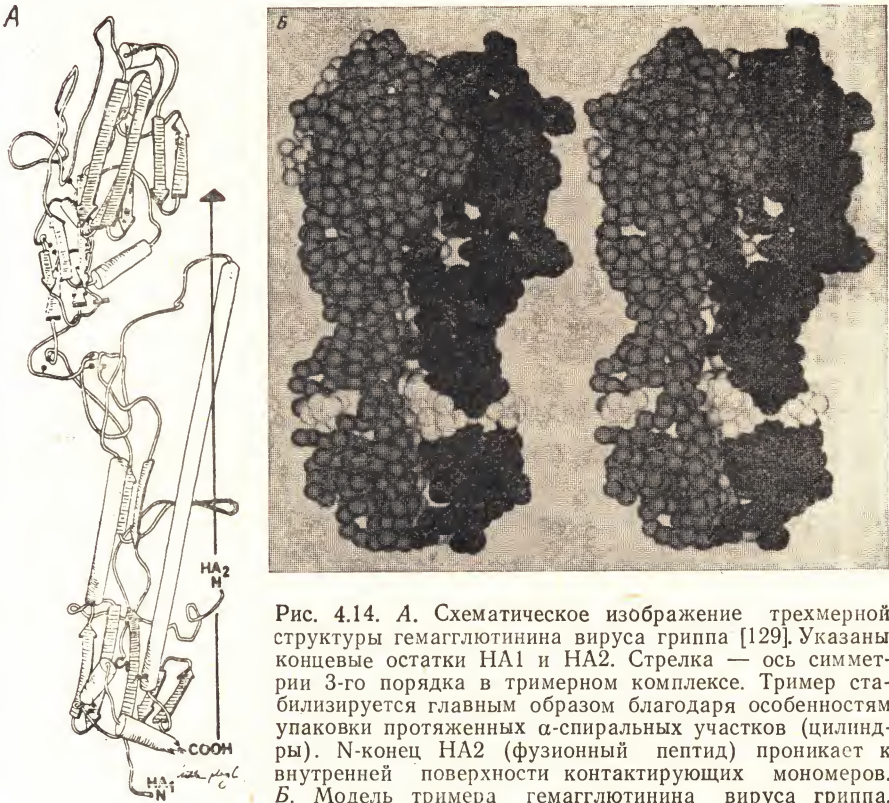


Рис. 4.14. А. Схематическое изображение трехмерной структуры гемагглютинина вируса гриппа [129]. Указаны концевые остатки HA1 и HA2. Стрелка — ось симметрии 3-го порядка в тримерном комплексе. Тример стабилизируется главным образом благодаря особенностям упаковки протяженных α -спиральных участков (цилиндры). N-конец HA2 (фузионный пептид) проникает к внутренней поверхности контактирующих мономеров. Б. Модель тримера гемагглютинина вируса гриппа, составленная из шариков, изображающих α -углеродные

атомы. Показан также фузионный пептид, который подобно поясу обвивает каждый из мономеров, прежде чем войти в область контакта мономеров. (Этот рисунок выполнен Р. Фельдманом с помощью компьютерного графопостроителя Национальных институтов здоровья)

ные цепи сопровождается какими-то конформационными изменениями. Прежде чем обернуться подобно поясу вокруг мономера, гидрофобный аминоконцевой пептид HA2, который участвует в слиянии мембран (см. разд. «Фузионная активность мембран и проникновение вируса»), проходит через поверхность раздела мономеров в тримере (рис. 4.14, Б). Основной структурной особенностью HA2 является наличие шпилькообразной петли из двух α -спиралей (цилиндры на рис. 4.14, А). Вторая спираль длиной 80 Å образует основу «ствола».

Тример образуется путем ассоциации длинных α -спиралей HA2 одного мономера с соответствующими симметричными спиральями двух других мономеров.

К аспарагиновым остаткам NA1 присоединены шесть олигосахаридных цепей [8, 22, 38, 81, 165, 285], а к NA2 — одна [154] (рис. 4.12). Все они, кроме присоединенных к остаткам 81 и 165, представляют собой процессированные сложные олигосахариды [116]. Самым необычным в структуре углеводов, входящих в состав НА, является их распределение ([129]; рис. 3). Все участки присоединения, кроме 165, находятся на боковых поверхностях молекулы. Один участок расположен у самого конца молекулы NA1 вблизи мембраны [8]. Олигосахарид в позиции 165, очевидно, играет роль в стабилизации олигомерных контактов между глобулами на вершине структуры.

Нейраминидаза вируса гриппа

Молекула нейраминидазы представляет собой тетрамер с осью симметрии 4-го порядка, перпендикулярной поверхности мембраны. Необычна «стволовая» часть молекулы нейраминидазы. Первые 45 аминокислотных остатков на участке после выхода молекулы из мембраны содержат 50% участков присоединения олигосахаридов [118]. Кроме того, в области ствола отсутствует гомология между молекулами нейраминидазы родствен-

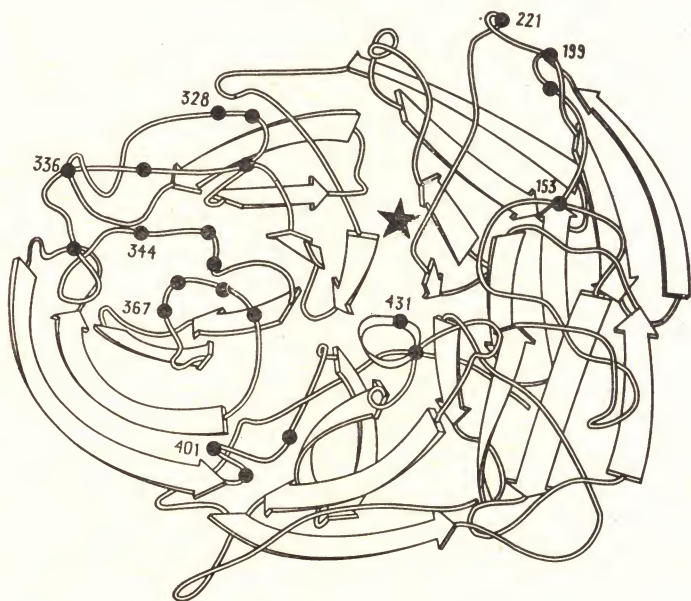


Рис. 4.15. Структура «головки» нейраминидазы вируса гриппа [23]. Активный центр фермента указан звездочкой. Черными кружками обозначены остатки семи вариабельных сегментов, формирующих антигенную поверхность.

ных штаммов вируса, хотя в области глобулярной головки имеет место значительная гомология [11]. Это позволило предположить, что ствол образован вытянутой полипептидной цепью мономера, образующей в тетрамере дисульфидные поперечные связи.

При расщеплении мембранных гликопротеинов трипсином происходит отделение уплощенных, квадратных в проекции глобулярных головок от N-концевого якорного и стволового участков [132]. Трехмерная структура головки НА установлена с помощью рентгеноструктурного анализа [23]. На рис. 4.15 схематически изображен тетрамер НА, если смотреть на него сверху (перпендикулярно изображению НА на рис. 4.14). Положение активного центра фермента (он указан звездочкой) определяли по связыванию сиаловой кислоты в кристалле. Вторичная структура мономера нейраминидазы весьма необычна: она состоит из шести сходных четырехцепочечных β -слоев, расположенных наподобие лопастей пропеллера.

Функции вирусных мембранных гликопротеинов

Связывание с рецептором

Для инициации инфекции гликопротеин вируса гриппа должен связаться с поверхностным рецептором клетки-мишени. Вирус связывается с рецептором, содержащим сиаловую кислоту, с помощью участка, расположенного на дальнем конце НА. Исходно этот участок был локализован на основании данных о группировке полностью консервативных остатков в поверхностном кармане (по результатам определения аминокислотных последовательностей): Tyr-98, His-183, Trp-153, Leu-194, Glu-190 и других (рис. 4.16, А) [129]. Эта локализация была подтверждена в опытах по отбору вирусных мутантов с измененной специфичностью к рецепторам, полученных при выращивании вируса в присутствии ингибиторов [80]. Вирусы, отобранные путем выращивания в присутствии неиммунных сывороток лошади или морской свинки (являющихся источниками ингибиторов, которые блокируют связывание НА с NeuAca2-6Gal), исследовали на их специфичность к рецепторам, используя для этой цели эритроциты кур, обработанные очищенными сиалилтрансферазами так, чтобы они содержали либо NeuAca2-3Gal, либо NeuAca2-6Gal. Мутантные вирусы связываются преимущественно с рецепторами, содержащими NeuAca2-3Gal, в то время как для вирусов дикого типа специфичны NeuAca2-6Gal. При секвенировании РНК вирусов, мутантных по гену НА, была выявлена замена остатка Leu-226, находящегося в описанном выше кармане; это коррелировало с изменениями фенотипа (рис. 4.16, Б). Вирус

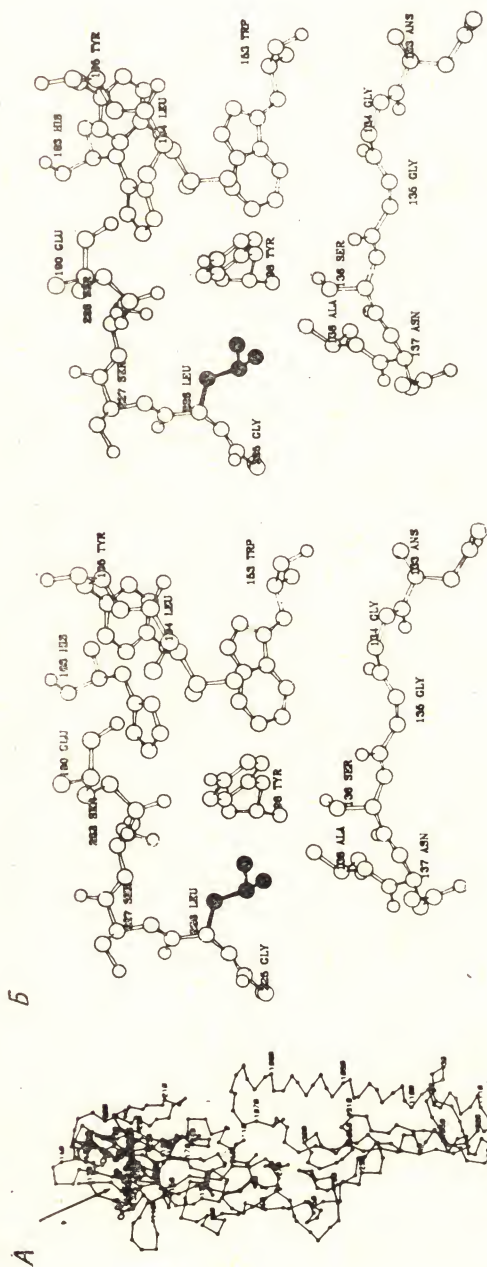


Рис. 4.16. А. Схематическое изображение α -углеродного скелета гемагглютинаина вируса гриппа Х31 (1968) и некоторые аминокислоты, расположенные в связывающем центре (кармане) рецептора сиаловой кислоты и вблизи него. Б. Детальное расположение остатков, представленных на рис. А, в проекции сверху. Leu-226 выступает в полость кармана вблизи центрального остатка Tyr-98. Структура, представленная на рисунке, связывает NeuAca2-6Gal, а замена Leu-226 на Glu приводит к специфическому связыванию NeuAca2-3Gal.

дикого типа (A/Aichi/68), у которого в положении 226 находился лейцин, связывался преимущественно с NeuAc α 2-6Gal, в то время как вариант с Glu-226 специфически связывался с последовательностью NeuAc α 2-3Gal. Вариант, содержащий в положении 226 метионин, обладал промежуточными свойствами.

Для детального выяснения структурной основы различий в связывании необходимо исследовать кристаллы, содержащие аналоги рецепторов.

Фузионная активность и проникновение вируса в клетку

Геном вируса с оболочкой отделен от цитоплазмы клетки-мишени двумя липидными мембранами — вирусной и клеточной. Для преодоления этих барьеров вирусы с оболочкой используют мембранный гликопротеин, обладающий способностью вызывать слияние мембран.

Вирус Сендай

Белок F вируса Сендай, вызывающий слияние мембран, синтезируется в виде неактивного предшественника F0, активирующегося в результате расщепления на два фрагмента — F1 и F2 [51, 84]. Расщепление сопровождается конформационными изменениями, приводящими к увеличению гидрофобности гликопротеина [53]. Необходимость протеолитической активации может ограничить круг хозяев вируса только такими тканями, в которых содержатся соответствующие протеазы [85]. Подавление слияния мембран с помощью синтетических пептидов, имеющих сходную с гидрофобным N-концом белка F1 последовательность аминокислот (см. ниже), свидетельствует об активности этого участка [78]. Белок вируса Сендай, вызывающий слияние мембран, отличается от соответствующих белков вирусов других семейств тем, что он активен во внеклеточной среде; он вызывает слияние клеток, ведущее к образованию синцития.

Эндоцитоз и проникновение вирусов в клетку

Фузионная активность большинства вирусов с оболочкой осуществляется не на клеточной поверхности. После связывания с поверхностными рецепторами клетки вирус гриппа, VSV, SFV и другие вирусы захватываются с помощью рецепторного эндоцитоза в эндосомные везикулы (эндосомы) [44, 66, 68, 69]. При этом нуклеиновая кислота вируса все еще остается отделенной от цитоплазмы двумя мембранами — вирусной и эндосомной. Как показывают результаты исследования ряда вирусов, понижение pH эндосом инициирует вызываемое вирусом слияние мемб-

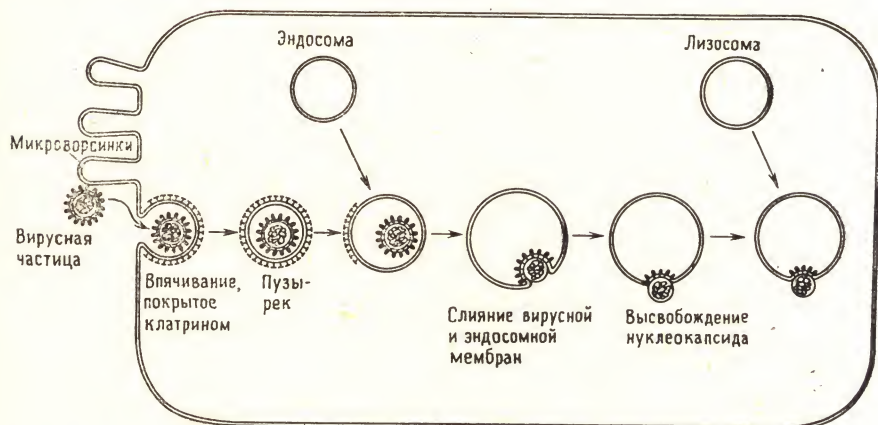


Рис. 4.17. Проникновение вируса в клетку [91]. Некоторые вирусы с оболочкой проникают в клетку путем эндоцитоза в покрытых клатрином везикулах. Затем везикулы теряют свою клатриновую оболочку и сливаются с крупными везикулами — эндосомами. При низких рН в эндосомных везикулах происходит слияние мембран, опосредованное вирусным гликопротеином; в результате вирусная и эндосомная мембраны сливаются и в цитоплазму высвобождается вирусный нуклеокапсид.

ран (вирусной и эндосомной), в результате чего вирусный геном оказывается в цитоплазме (рис. 4.17) [124]. Выделен компонент, который, возможно, выполняет функции эндосомного протонного насоса, снижающего рН [31, 98]. Слияние на клеточной поверхности можно вызвать *in vitro* путем искусственного снижения рН внеклеточной среды. Таким образом удалось определить оптимальное значение рН для слияния мембран целого ряда вирусов. Для SFV оно оказалось равным 6,0; для VSV — 6,1; для разных штаммов вируса гриппа — от 5,0 до 5,5 [64, 123, 125]. Определение оптимального рН слияния требует очень точного титрования.

Фузионная активность вируса гриппа

Представление о том, что гемагглютинин вируса гриппа — это единственный белок, необходимый для слияния, получило окончательное подтверждение в опытах по молекулярному клонированию и экспрессии гена НА в культуре клеток почек обезьян [35]. Такие клетки, содержащие на поверхности НА вируса гриппа, при обработке буферным раствором с рН 5,0 сливались в поликарионы [121]. Для проявления фузионной активности НА, а следовательно, его способности обеспечивать инфекционность вируса необходимо, чтобы белок-предшественник НА0 расщепился на НА1 и НА2 [53а, 55, 125]. N-концевая последователь-

ность HA2 (рис. 4.11), называемая *фузионным пептидом* или *пептидом слияния*, является самым длинным в этой молекуле сегментом, состоящим из консервативных остатков, а также наиболее гидрофобным после сигнального пептида и С-концевого якорного участка [93]. Первые предположения о роли этого участка в процессе слияния мембран были высказаны после обнаружения его гомологии с аналогичным участком молекулы белка F вируса Сендай [36]. На рис. 4.18 приведены аминокис-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A/AICHI/2/68	GLY	LEU	PHE	GLY	ALA	ILE	ALA	GLY	PHE	ILE	GLU	ASN	GLY	TRP	GLU	GLY	MET	ILE	ASP	GLY	TRP	TYR	GLY
A/DUCK/UKR/63 ^a																							
A/DUCK/UKR/63 ^b		ILE																					
A/NT/60/68																							
A/HEM/102/72																							
A/VIC/3/75		ILE																					
A/PR/8/34												GLY				THR							
A/JAP/305/57												GLY				GLN		VAL					
A/WSN/33												GLY				THR							
A/FPV/RO3/34																							
A/BELLAMY/42												GLY				THR	LEU	VAL					
A/WEISS/43												GLY				THR							
B/LBE/40		PHE									LEU	GLY								ALA		HIS	
B/MD/59		PHE									LEU	GLY								ALA		HIS	
B/HK/8/73		PHE									LEU	GLY								ALA		HIS	
C/JOHAN/1/66		ILE				ILE		(ASP)	LEU	ILE													
Sendai		PHE	PHE	GLY	ALA	VAL	ILE	GLY	THR	ILE	ALA	LEU	GLY	VAL	ALA	THR	ALA	ALA	GLN	ILE	THR		
SV5				ALA	VAL						LEU	ALA							VAL				
NEW		ILE				ILE			GLY	VAL													

Рис. 4.18. Аминокислотные последовательности фузионных пептидов [13, 28, 36, 49, 50, 57, 58, 72, 76, 78, 93, 95, 105, 130]. Первые 12 последовательностей представляют собой N-концевые участки HA2 вируса гриппа А, следующие три — последовательности вируса гриппа В, последняя строка в этой группе — фузионный пептид вируса гриппа С. Незаполненные позиции обозначают, что имеет место полная гомология с гемагглютинином Aichi (1968) (первая строка). Вторая группа последовательностей представляет N-концевые участки белка F1 парамиксовирусов. Для максимального совпадения с последовательностями HA вируса гриппа эти последовательности сдвинуты, так что они начинаются с позиции 2. Остатки, совпадающие у HA Aichi (1968) и белка F1 вируса Сендай, подчеркнуты.

лотные последовательности фузионных пептидов вирусов гриппа и парагриппа; видно, что эти последовательности гидрофобны и обогащены глицином.

Как видно из рис. 4.14, А и Б, фузионный пептид на N-конце HA2 располагается между мономерами в тримере HA. Он находится на расстоянии 35 Å от конца молекулы, направленного в сторону вирусной мембраны, и на расстоянии 100 Å от противоположного конца, несущего участок, который связывается с сиаловой кислотой на мембране клетки-мишени. Такая локализация предполагает, что при низком pH молекула претерпевает конформационные изменения, в результате которых происходят экспонирование фузионного пептида и, возможно, сближение вирусной мембраны и мембраны клетки-мишени [129].

Конформационные изменения, наблюдаемые в ВНА¹, происходят при том же самом, оптимальном для слияния, низком значении рН [94]. При рН 5,0 фузионный пептид ВНА экспонируется и получает возможность вступать в новые гидрофобные взаимодействия. In vitro ВНА при низком рН агрегирует с образованием белок-белковых мицелл, сходных с теми, которые формируют мембранные белки, несущие интактный заякоривающий пептид (напомним, что ВНА — это НА, лишенный заякоривающего пептида). Агрегацию ВНА при низком рН можно предотвратить, включив его в мицеллы неионного детергента или в липидные везикулы. Если удалить фузионный пептид, то агрегации ВНА, а также связывания с мицеллами детергента или с липидным бислоем не происходит. Обработка ВНА термолизином в конформации, свойственной ему при низком рН, приводит к отщеплению аминокислот 1—23, а также к утрате приобретенных при низком рН гидрофобных свойств [26]. Это прямо указывает на то, что N-концевой фузионный пептид НА2 является гидрофобным участком, который экспонируется в результате конформационных изменений при низких рН. Дальнейшие подтверждения важной роли конформационных изменений ВНА при низком рН были получены в опытах по расщеплению ВНА трипсином, показавших, что пептидные связи в позициях 27 и 224 НА1, обычно спрятанные в структуре тримера, экспонируются при низком рН. Фактически всю верхнюю часть молекулы НА1 (с 28 по 328 остаток) можно отделить от нерастворимого НА2 и части НА1 (остатки 1—27) после обработки белка, находящегося в конформации, принимаемой им при низком рН, трипсином (рис. 4.19) [94]. Эти результаты позволяют предположить, что конформационные изменения, активирующие слияние мембран, захватывают как ту стволовую часть молекулы НА2, где N-конец погружается во внутреннюю область тримера, так и участки НА1, контактирующие со «стволом». Как свидетельствуют данные КД, глобулярная структура домена на вершине ВНА, по-видимому, сохраняется после обработки трипсином при низком рН; об этом свидетельствует также способность упомянутого домена связываться с моноклональными антителами, специфичными для его конформации при нормальном рН (см. следующий раздел).

Как происходит слияние мембран вируса и клетки-мишени после конформационных изменений НА, индуцированных низким рН, — пока неясно. Поскольку вирус гриппа может сливаться с искусственными липосомами, не имеющими белков и рецепторов, несущих сигналовую кислоту, можно предположить, что мем-

¹ ВНА — это гемагглютинин, получающийся при обработке вирионов бромелаином. — Прим. ред.

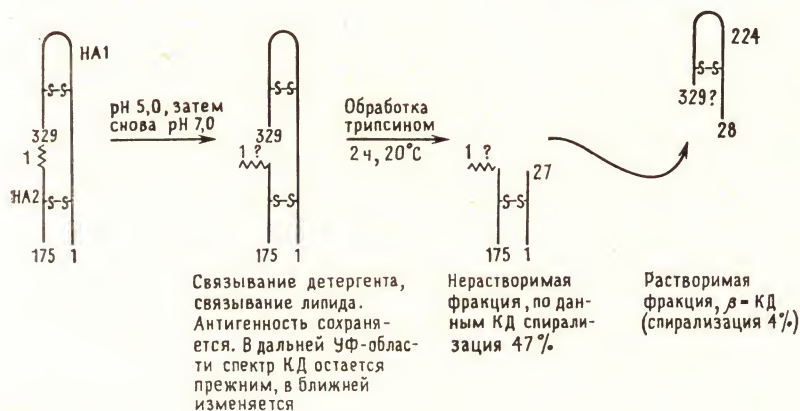


Рис. 4.19. Изменения в структуре ВНА вируса гриппа при рН 5,0 [94]. Происходящие конформационные изменения включают экспонирование гидрофобного фузионного пептида на N-конце HA2. В результате при обработке трипсином в мягких условиях происходит расщепление HA1 по положению 27 и образуются растворимая фракция HA1 (остатки 28—328) и нерастворимая, в которую входят HA1 (остатки 1—27) и весь HA2. Отсюда следует, что при низком рН изменяются и поверхность контакта в тримере, где был скрыт фузионный пептид, и стволовая часть молекулы в области контакта между HA1 и HA2.

брана-мишень распознается непосредственно пептидом слияния [65, 68, 124]. Таким образом, HA становится как бы интегральным мембранным белком обеих мембран — вируса и клетки, удерживаясь в первой своим закоривающим пептидом, а во второй — пептидом слияния. Детали процесса, в результате которого конформационные изменения HA позволяют мембранам так тесно сблизиться, а также механизм последующей перестройки липидов неизвестны. Процессы слияния мембран в биологических системах универсальны, однако вряд ли есть более доступные для изучения случаи слияния, чем индуцированные вирусами.

Иммунное распознавание и антигенная структура вирусных гликопротеинов

При заражении клетки вирусом с оболочкой иммунная система клетки образует антитела против вирусных мембранных гликопротеинов. Эти антигены служат также мишенями для сывороточных антител, формирующихся в результате вакцинации. Расшифровка структуры гликопротеинов вируса гриппа позволила не только выявить распознаваемый антителами участок этого гликопротеина, но и понять, как антигенные вариации изменяют распознавание.

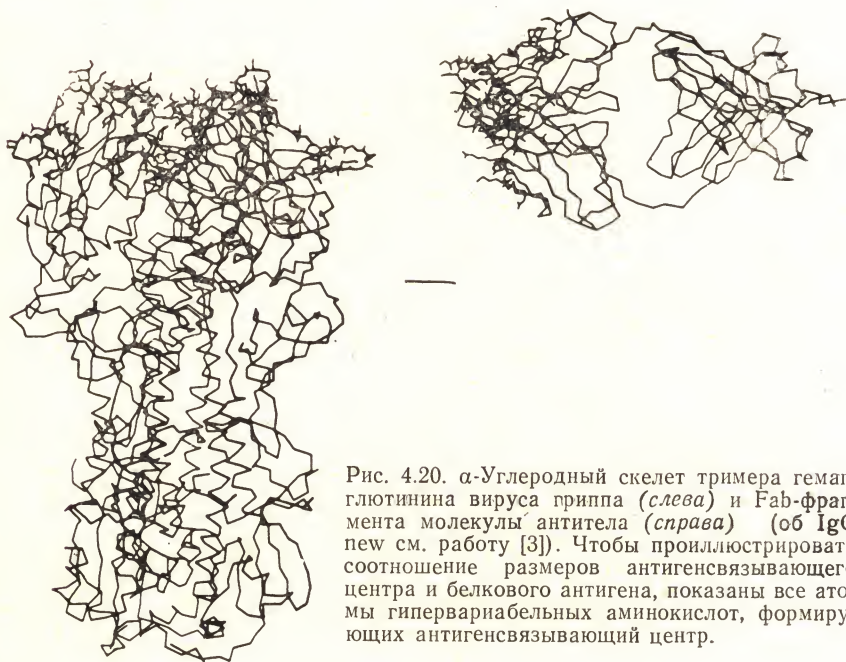


Рис. 4.20. α -Углеродный скелет тримера гемагглютинаина вируса приппа (слева) и Fab-фрагмента молекулы антитела (справа) (об IgG new см. работу [3]). Чтобы проиллюстрировать соотношение размеров антигенсвязывающего центра и белкового антигена, показаны все атомы гипервариабельных аминокислот, формирующих антигенсвязывающий центр.

Иммунологический фон

Всесторонне изучена антигенная структура небольших белков, таких как лизоцим и миоглобин [6, 7, 25]. Как показывают опыты по химической модификации и биохимический анализ, молекулы антител гипериммунной сыворотки распознают специфические участки глобулярного белка, называемые антигенными детерминантами. По-видимому, у миоглобина эти участки представляют собой линейные последовательности, образующие перегибы, а у лизоцима они не являются линейными последовательностями и их нельзя отнести к какому-то определенному типу вторичных структур. Недавнее введение в практику исследований моноклональных антител, продуцируемых клоном одной секретирующей антитела клетки и поэтому специфичных только к одному участку антигена, позволит изучать комплексы антител с индивидуальными участками антигена [9]. Это существенно пополнит наши знания об этих простых белковых антигенах.

Структура антител исследована довольно полно. С помощью рентгеноструктурного анализа IgG и фрагментов, связывающихся с антигенами (Fab-участков), установлена трехмерная структура нескольких антител [3]. К настоящему времени эти исследования проведены на моноклональных антителах, образуемых

клетками спонтанных злокачественных опухолей, секретирующих антитела, антигенная специфичность которых неизвестна. Поэтому детальные структурные исследования взаимодействия антител с антигенами проведены только для небольших молекул гаптенов, отобранных путем скрининга. Антигенсвязывающий центр — это карман, образованный гипервариабельными участками двух цепей молекулы IgG. Карман расположен на поверхности и имеет диаметр около 30 Å. На рис. 4.20 указаны гипервариабельные аминокислоты антигенсвязывающего центра Fab-фрагмента молекулы IgG new. Чтобы дать представление о соотношении размеров антигена и антигенсвязывающего центра молекулы антитела, на рисунке представлен также тример гемагглютиниона вируса гриппа.

Антигенная структура НА вируса гриппа

Все антитела, нейтрализующие вирус гриппа, представляют собой антитела к НА. Вследствие антигенной изменчивости НА возникают повторные эпидемические вспышки гриппа. После первого выделения вируса гриппа в 1933 г. (штамм H1) были зарегистрированы две пандемии — в 1957 и 1968 гг. В обоих случаях антигенные свойства НА вирусов, вызвавших пандемии, заметно различались. Соответствующие варианты получили обозначения H2 и H3. Первый из них, «азиатский», включал штаммы, ответственные за вспышки гриппа с 1957 по 1968 г., а второй, «гонконгский», — штаммы, появившиеся в 1968 г. и преобладающие до сих пор [131]. В каждую из этих пандемических эр периодически (с интервалом в несколько лет) регистрировались эпидемии, вызванные вирусами, которые подверглись *антигенному дрейфу* по отношению к прототипным штаммам [16].

Результаты определения аминокислотных последовательностей НА природных и отобранных в лаборатории антигенных вариантов вирусов гриппа подтипа H3 [72, 97, 123] позволили предположить, что за взаимодействие с антителами ответственны области трехмерной структуры НА, которые во время антигенного дрейфа подвергаются структурным изменениям [128]. На рис. 4.21, А и Б указаны замены аминокислот, которые произошли в НА штамма 1968 г. между 1968 г. и эпидемиями, вызванными в 1972 г. вариантом Мем/102/72 и в 1975 г. вариантом Vic/3/75. В цепи HA1 варианта А/Мем/102/72 выявлена замена 14 аминокислот по сравнению с А/Aichi/2/68, а в цепи HA1 варианта А/Vic/3/75 заменены еще 16 аминокислот. На рис. 4.21, В указана замена единичных аминокислот в антигенных мутантах, отобранных при выращивании в присутствии моноклональных

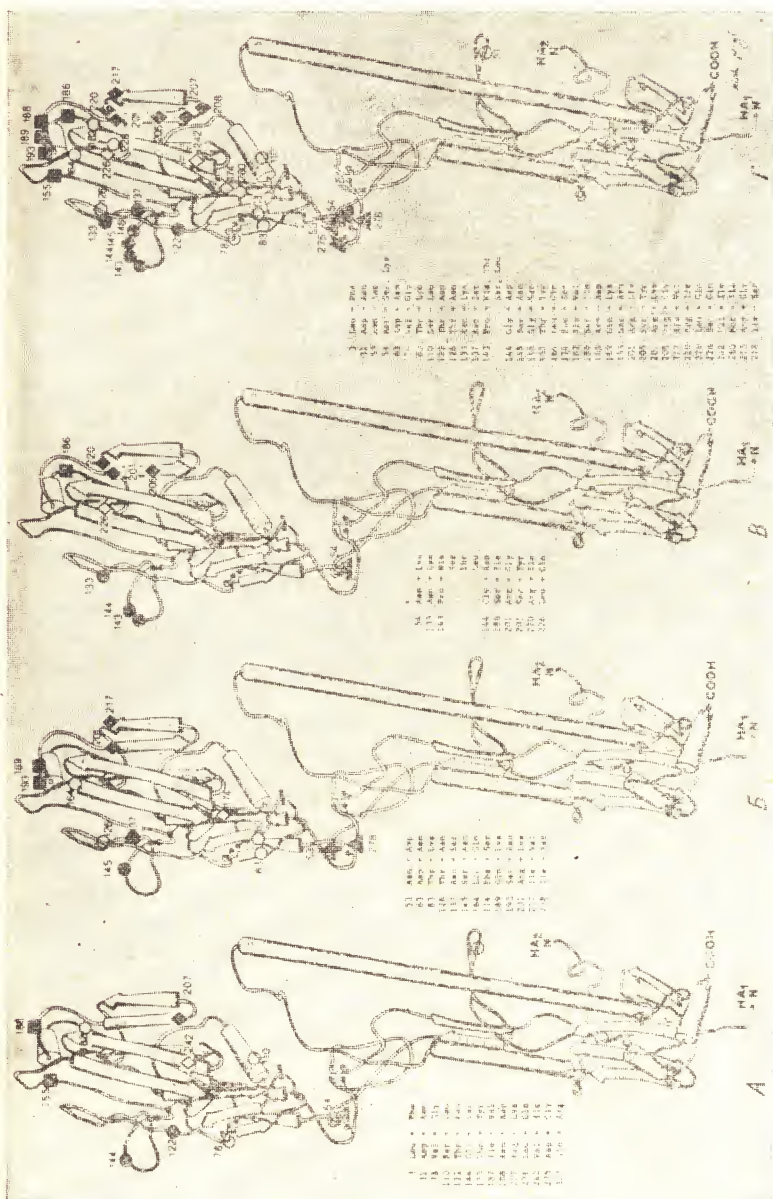


Рис. 4.21. Схематическое изображение мономера гематглютинаина Aichi 1968 с указанием аминокислотных замен в HA1 (см. текст). А. Замены аминокислот Aichi/2/68 — Mem/102/72 [4—6, 10, 11]. Б. Замены аминокислот Mem/102/72 — Vic/3/75. В. Полученные в лаборатории антигенные варианты, выращенные в присутствии моноклональных антител или наиболее авидных фракций антител. Г. Все известные замены аминокислот, произошедшие с 1968 по 1977 г., включая замены в лабораторных вариантах [128]. Трехмерное (стерео) изображение молекулы в той же проекции приведено в работе [1], рис. 3.

антител [60]. Каждая строчка отвечает вирусу с одной заменой, сопровождавшейся резким уменьшением сродства моноклональных антител к НА. На рис. 4.21, Г суммированы замены, произошедшие с 1968 по 1977 г., включая изменения в лабораторных вариантах, представленные на рис. 4.21, В. Из этих данных следует, что молекула НА имеет четыре антигенных участка. Участок А (он обозначен черными кружками) находится на выступающей петле, образованной аминокислотами 140—146. Участок В (черные квадратики) включает выступающую петлю над остатком 155 и наружные остатки 187—198 вокруг α -спирали на дистальном конце молекулы. Участок С (черные треугольники) (остатки 53, 54, 275, 278) представляет собой выпуклость в третичной структуре, расположенную ниже глобулярного домена. Участок D (черные ромбики) (остатки 207, 174 и т. д.) охватывает остатки на поверхности НА, а также, возможно, некоторые аминокислоты на поверхности, разделяющей мономеры (светлые ромбики). Детальные сведения о том, как сказывается изменение заряда и стерических свойств НА при внесении в него обнаруженных замен на связывании антител, приведены в работе [128]. На основании проведенного анализа было сделано заключение, что у обоих вирусов, вызвавших в рассматриваемый период эпидемии, имелось по крайней мере по одной мутации в каждом из четырех описанных выше антигенных участков; это, по-видимому, необходимо для того, чтобы вирус мог избежать нейтрализации антителами.

Эти результаты получили подтверждение при исследовании НА вируса A/Bangkok/1/79, вызвавшего эпидемию гриппа в 1979 г. В этих опытах были выявлены дополнительные изменения в каждом из предполагаемых антигенных участков [96]. В результате анализа большого количества вариантов НА 1968 г., отобранных с помощью моноклональных антител (рис. 4.22, А), было прямо подтверждено наличие участков В и А и установлено, что антитела распознают также участок Е (черные перевернутые треугольники) [27]. На рис. 4.22, Б представлены антигенные участки, выявленные как у природных, так и у отобранных с помощью моноклональных антител вариантов штаммов H3, выделенных между 1968 и 1979 гг.

Особое значение имеет моноклональное антитело, с помощью которого отобран вариант с заменой Asp на Asn в позиции 63 (рис. 4.22, А), поскольку в результате в эту позицию вводится олигосахарид. Это прямо указывает на то, что углеводы могут влиять на иммунологическое распознавание структуры гликопротеина, по-видимому, путем стерического маскирования поверхности белковой молекулы. Углеводы, вероятно, могут модулировать распознавание гемагглютинина, маскируя часть антигенных зон у некоторых штаммов [128]. На это указывает наличие в НА

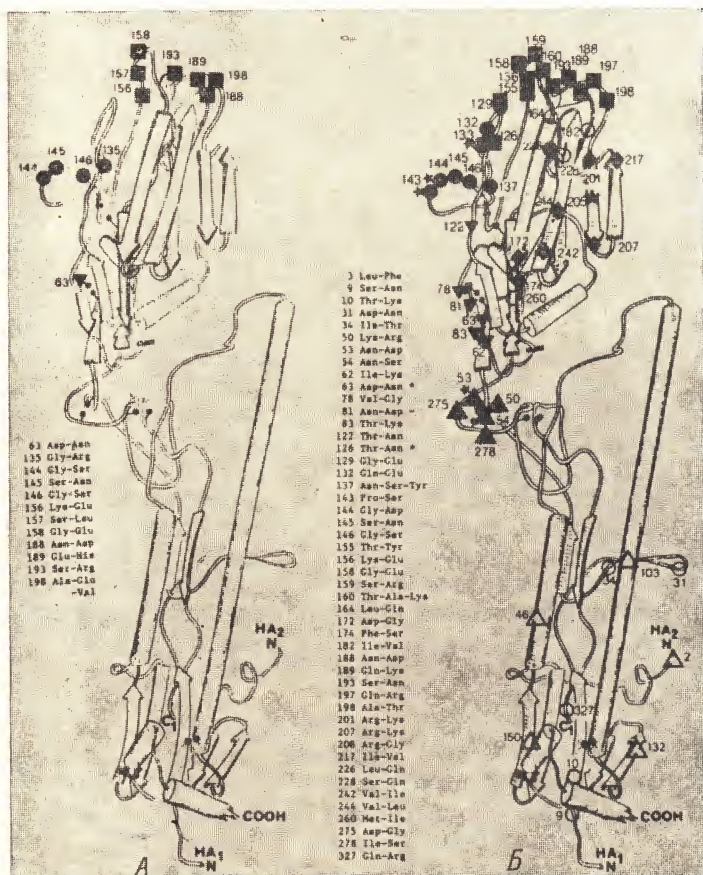


Рис. 4.22. Антигенные варианты Х31 (Aichi/68), отобранные с помощью моноклональных антител. Указаны замены аминокислот, выявленные в результате секвенирования гена НА. Каждый символ представляет один вариант (см. текст). Б. Природные варианты гемагглютиниона, выделенные между 1968 и 1979 гг. (моноклональные варианты Mem/72 отмечены звездочкой). (Из [27], с разрешения; © 1984 by Elsevier Publishing Co., Inc.)

других подтипов возможных мест присоединения олигосахаридов, расположенных в тех участках, которые в НА подтипа НЗ рассматриваются как антигенные.

Сравнение гемагглютининов подтипов Н1 и Н3

Исходя из гомологии аминокислотных последовательностей НА1 (35%) и НА2 (53%), а также консервативности дисульфидных связей, можно полагать, что структуры НА у вирусов

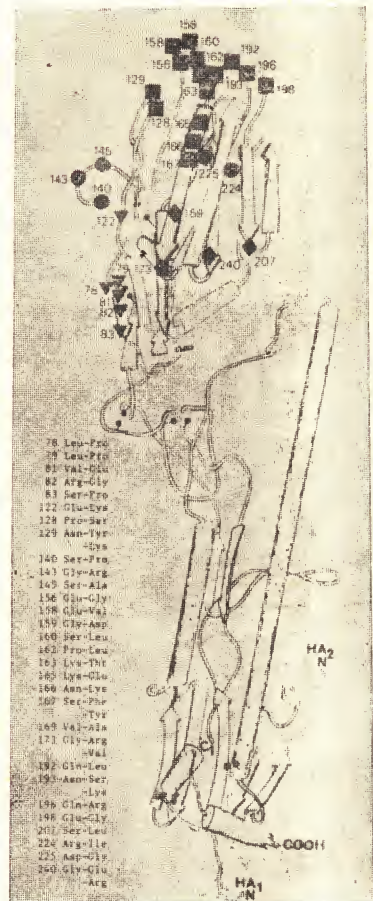
Рис. 4.23. Варианты гемагглютини́на А/PR/8/34 Н1, отобранные с помощью моноклональных антител [19], наложенные на структуру НЗ 1968 (рис. 4.22, Б). (Из [27], с разрешения; © 1984 by Elsevier Science Publishing Co., Inc.)

подтипов НЗ (1968—1983) и Н1 (1933—1956) в целом сходны [105, 116, 130].

Такие архитектурные конструкции, как петли, спирали и т. д., которые являются антигенными участками, окружены у штаммов подтипа НЗ консервативными остатками, которые имеются также у штаммов Н1, что свидетельствует о сохранении даже этих деталей. Для определения антигенной структуры молекулы НА вирусов подтипа Н1 была определена нуклеотидная последовательность 35 генов НА разных вариантов штамма А/PR8/34 подтипа Н1, отобранных с помощью моноклональных антител [19]. Сравнение участков, распознаваемых антителами на структурах вируса 1968 г., с участками, распознаваемыми мышиными моноклональными антителами на структурах вируса 1934 г., выявило их поразительное сходство (ср. рис. 4.23 и 4.22, Б); этот вопрос обсуждается в работах [19, 26, 27]. Отмечено и одно интересное различие: участок 165—167, являющийся продолжением участка В в НА вируса 1934 г., замаскирован в НА 1968 г. олигосахаридной цепью, вследствие чего у этого штамма он не распознается антителами.

Сходное, но менее полное исследование, проведенное со штаммами вируса гриппа типа В, показало, что в антигенном связывании участвуют аналогичные участки; в некоторых случаях также обнаружены олигосахаридные цепи, маскирующие участки, являющиеся антигенами [57, 58].

Все ли антигенные участки, указанные выше, распознаются достаточно большой фракцией антител в иммунной сыворотке человека, чтобы играть роль в цикле угасания циркуляции и но-



вого появления вируса в связи с антигенным дрейфом,—неизвестно. Высказывалось предположение, что доминантным может быть один антигенный участок (или лишь несколько) [60]. Возможно, это связано с большей доступностью некоторых поверхностных петель и, следовательно, с формированием высокоаффинных антител [128]; это и обуславливает наличие участков, оказавшихся иммунодоминантными в условиях «антигенного отбора» [92]. Однако при исследовании постинфекционных сывороток человека обнаружилось, что более 50% таких сывороток, содержащих антитела против A/Vic/3/75, могут нейтрализовать отобранный с помощью моноклональных антител вариант этого вируса. Такие результаты как будто указывают на то, что цельная сыворотка человека распознает более одного доминантного участка [73а]. В каких относительных количествах присутствуют в иммунных сыворотках человека антитела к индивидуальным антигенным участкам НА и какова аффинность таких антител—неясно. Теперь эту проблему можно решить, воспользовавшись коллекциями отобранных с помощью моноклональных антител вариантов вирусов с известными заменами в аминокислотных последовательностях их НА.

Вакцины

Существуют разные стратегии индукции антител против вирусных мембранных гликопротеинов; они детально обсуждаются в разных работах, например в обзоре [104]. Недавно на лабораторных животных удалось получить антитела к небольшим синтетическим пептидам, аминокислотная последовательность которых соответствовала определенному участку белкового антигена [73, 101, 110]. Например, было показано, что ряд пептидов с такой же последовательностью, как у НА вируса гриппа подтипа Н3, содержащих от 7 до 40 аминокислот, индуцируют антитела, которые обнаруживают перекрестную реакцию как с НА, так и с интактным вирусом гриппа [33, 73]. Это позволяет думать, что небольшие синтетические пептиды во время взаимодействия с поверхностными иммуноглобулинами клеток, секретирующих антитела, способны формировать структуры, сходные по конформации с белком НА. Уменьшение конформационной энтропии подвижных пептидов, очевидно, компенсируется соответствующим изменением свободной энергии связывания с антителами. Не исключено, что в процессе распознавания антителом изменяется локальную структуру белкового антигена. Доля антител в антипептидной сыворотке, распознающих интактный белок, и их сродство к интактному белку не установлены; однако обнаружение антител с низким сродством позволяет думать, что, возможно, необходим тщательный отбор соответствующих пептидов [74].

Имеются данные о том, что пептиды способствуют защите от инфекции у некоторых лабораторных животных [10].

Антигенная структура нейраминидазы вируса гриппа

Недавно начато сравнительное изучение аминокислотных последовательностей и моноклональных вариантов нейраминидазы вируса гриппа. Хотя антитела против нейраминидазы не относятся к нейтрализующим, в их присутствии клинические симптомы заболевания становятся менее выраженными. На рис. 4.15 указаны участки NA, взаимодействующие с антителами [23]. В этом случае детерминанты образуют некую поверхность на вершине молекулы, окружая каталитический центр.

Литература

1. Air G. M. (1980). Nucleotide sequence coding for the "signal peptide" and N terminus of the haemagglutinin from an Asian (H2N2) strain of influenza virus, *Virol.*, **97**, 468—472.
2. Air G. M. (1980). Sequence from the 3' ends of influenza virus RNA segments. In: *Structure and Variation of Influenza Virus*, ed. by W. G. Laver and G. M. Air, pp. 135—146, Elsevier-North Holland, New York.
3. Amzel L. M., Poljak R. J. (1979). Three-dimensional structure of immunoglobulins, *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 961—997.
4. Amzel L. M., Poljak R. J., Saul F., Vraga J. M., Richards F. (1974). The three-dimensional structure of a combining region-ligand complex of immunoglobulin NEW at 3.5 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1427—1430.
5. Anilionis A., Wunner W. H., Curtis P. J. (1981). Structure of the glycoprotein gene in rabies virus, *Nature*, **924**, 275—278.
6. Atassi M. Z. (1977). The complete antigenic structure of myoglobin: conclusions for antigenic structures of proteins. In: *Immunochemistry of Proteins*, Vol. 2, ed. by M. Z. Atassi, pp. 77—176, Plenum Press, New York.
7. Atassi M. Z., Lee C. H. (1978). The precise and entire antigenic structure of native lysozyme, *Biochem. J.*, **171**, 429—434.
8. Bachmayer H. (1975). Selective solubilization of hemagglutinin and neuraminidase from influenza viruses, *Intervirology*, **5**, 260—272.
9. Berzotsky J. A., Buckenmeyer G. K., Hicks G., Gurd F. R. N., Feldman R. J., Minna J. (1982). Topographic antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies to sperm whale myoglobin, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3189—3198.
10. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R., Rowlands D. J., Brown F. (1982). Protection against food-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence, *Nature*, **298**, 30—33.
11. Blok J., Air G. M. (1982). Variation in the membrane-insertion and "stalk" sequences in eight subtypes of influenza type A virus neuraminidase, *Biochemistry*, **21**, 4001—4007.
12. Bosselman R. A., Von Straaten F., Van Beveren C., Verma I. M., Vogt M. (1982). Analysis of the env gene of a molecularly cloned and biologically active Moloney mink cell focus-forming proviral DNA, *J. Virol.*, **44**, 19—31.
13. Both G. W., Sleight M. S. (1980). Complete nucleotide sequence at the haemagglutinin gene from a human influenza virus of the Hong Kong subtype, *Nucl. Acid. Res.*, **8**, 2561—2575.
14. Brady M. I., Furminger I. G. S., Stones P. B. (1976). *Postgrad. Med. J.*, **52**, 368—373.

15. Brand C. M., Skehel J. J. (1972). Crystalline antigen from the influenza virus envelope, *Nature*, **238**, 145—147.
16. Burnet F. M. (1955). Ecological aspects of virus disease, *Princ. Anim. Virol.*, **382**.
17. Cartwright B., Smale C. J., Brown F. (1970). Structural and biological relations in vesicular stomatitis virus. In: *The Biology of Large RNA Viruses*, ed. by R. D. Barry and B. W. J. Mahy, pp. 115—132, Academic Press, New York.
18. Cartwright B., Talbot P., Brown F. (1970). The proteins of biologically active subunits of vesicular stomatitis virus, *J. Gen. Virol.*, **7**, 267.
19. Caton J. J., Brownlee C. C., Yewdell P. A., Gerhard W. (1982). The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 haemagglutinin (H₁ subtype), *Cell*, **31**, 417—427.
20. Choppin P. W., Compans R. W. (1970). Phenotypic mixing of envelope proteins of the parainfluenza virus SV5 and vesicular stomatitis virus, *Virology*, **5**, 609—616.
21. Choppin P. W., Compans R. W. (1975). Replication of paramyxoviruses, *Compr. Virol.*, **4**, 95.
22. Choppin P. W., Klenk H.-D., Compans R. W., Caliquiri A. (1971). The parainfluenza virus SV5 and its relationship to the cell membrane. In: *Perspectives in Virology*, ed. by M. Pollard, pp. 127—158, Academic Press, New York.
23. Colman P. M., Varghese J. N., Laver W. G. (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase, *Nature*, **303**, 41—47.
24. Compans R. W. (1971). Location of the glycoprotein in the membrane of Sindbis virus, *Nature*, **229**, 114.
25. Crumpton M. J. (1975). In: *The Antigens*, Vol. 2, ed. by M. Sela, p. 1, Academic Press, New York.
26. Daniels R. S., Douglas A. R., Skehel J. J., Waterfield M. D., Wilson I. A., Wiley D. C. (1984). Studies of the influenza virus haemagglutinin in the pH5 conformation. In: *The Origin of Pandemic Influenza Viruses*, ed. by G. W. Laver and C. M. Chu, Elsevier-North Holland, New York.
27. Daniels R. S., Douglas A. R., Gonsalves-Scarano F., Palu G., Skehel J. J., Brown E., Knossow M., Wilson I. A., Wiley D. C. (1984). Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin. In: *The Origin of Pandemic Influenza Viruses*, ed. by G. W. Laver and C. M. Chu, Elsevier-North Holland, New York.
28. Fang R., Min Jou W., Huylebroeck D., Devos R., Fiers W. (1981). Complete structure of A/duck/ukraine/63 influenza haemagglutinin gene: Animal virus as progenitor of human H₃ Hong Kong 1968 influenza haemagglutinin, *Cell*, **25**, 315—323.
29. Fields S., Winter G., Brownlee G. G. (1981). Structure of the neuraminidase gene in human influenza virus A/PR/8/34, *Nature*, **290**, 213—217.
30. Finch J. T., Gibbs A. J. (1970). The structure of the nucleocapsid filaments of the paramyxo-viruses. In: *The Biology of Large RNA Viruses*, ed. by R. D. Barry and B. W. J. Mahy, pp. 115—132, Academic Press, New York.
31. Forgac M., Cantley L., Wiedenmann B., Altstiel L., Branton D. (1983). Clathrin-coated vesicles contain an ATP-dependent proton pump, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1300—1303.
32. Garoff H., Simons K. (1974). Location of the spike glycoproteins in the Semliki Forest virus membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3988—3992.
33. Garoff H., Frischauf A.-M., Simons K., Lehrach H., Delius H. (1980). Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki Forest virus membrane glycoproteins, *Nature*, **228**, 236—241.
34. Gething M. J., Bye J., Skehel J. J., Waterfield M. D. (1980). Cloning and

- DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H₂ and H₃ strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus, *Nature*, **287**, 301—306.
35. *Gething M. J., Sambrook J.* (1981). Cell-surface expression of influenza haemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene, *Nature*, **293**, 620—625.
 36. *Gething M. J., White J. M., Waterfield M. D.* (1978). Purification of the fusion protein of Sendai virus: Analysis of the NH₂-terminal sequence generated during precursor activation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2737—2740.
 37. *Green J., Griffiths G., Louvard D., Quinn P., Warren G.* (1981). Passage of viral membrane proteins through the Golgi complex, *J. Mol. Biol.*, **152**, 663—698.
 38. *Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shimmick T. M., Sutcliffe J. G., Lehrner R. A.* (1982). Immunogenic structure of the influenza virus haemagglutinin, *Cell*, **28**, 477—487.
 39. *Hall W., Martin S. J.* (1974). The biochemical and biological characteristics of the surface components of measles virus, *J. Gen. Virol.*, **22**, 363.
 40. *Harrison S. C.* (1983). Virus structure: High resolution perspectives. In: *Advances in Virus Research*, Vol. 28, ed. by M. Lauffer and K. Maramorosch, pp. 175—240, Academic Press, New York.
 41. *Harrison S. C., Jumbblatt J., Darnell J. E.* (1971). Lipid and protein organization in Sindbis virus, *J. Mol. Biol.*, **60**, 523—528.
 42. *Hay A.* (1974). Studies on the formation of the influenza virus envelope, *Virology*, **60**, 398—418.
 43. *Helenius A., Kartenbeck J.* (1980). The effects of octylglucoside on the Semliki Forest virus membrane, *Eur. J. Biochem.*, **106**, 613—618.
 44. *Helenius A., Marsh M.* (1982). Endocytosis of enveloped animal viruses. In: *Membrane Recycling*, CIBA Foundation Monographs Symposium, Vol. 92, pp. 59—76, Pittman Books, Ltd., London.
 45. *Helenius A., Soderlund H.* (1973). Stepwise dissociation of the Semliki Forest virus membrane with Triton X-100, *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 287—300.
 46. *Helenius A., Tanford C.* (1978). Semliki Forest virus membrane proteins, preparation and characterization of spike complexes soluble in detergent-free medium, *Methods Enzymology*, **56**, 734—739.
 47. *Helenius A., von Bonsdorff C.-H.* (1976). Semliki Forest virus membrane proteins preparation and characterization of spike complexes soluble in detergent-free medium, *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 895—899.
 48. *Henderson R., Unwin P. N. T.* (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature*, **257**, 28—32.
 49. *Herrler G., Nagele A., Meir-Ewert H., Brown A., Compans R. W.* (1981). Isolation and structural analysis of influenza C virion glycoproteins, *Virology*, **113**, 439.
 50. *Hiti A. L., Davis A. R., Nayak D. P.* (1981). Complete sequence analysis shows that the haemagglutinins of the H₀ and H₂ subtypes of human influenza virus are closely related, *Virology*, **110**, 113—124.
 51. *Homma M., Onuchi M.* (1973). Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells, *J. Virol.*, **12**, 1457—1465.
 52. *Horzinek M., Mussgay M.* (1969). Studies on the nucleocapsid structure of a group A arbovirus, *J. Virol.*, **4**, 514—520.
 53. *Hsu M.-C., Scheid A., Choppin P. W.* (1981). Activation of the Sendai virus protein (F) involves a conformational change with exposure of a new hydrophobic region, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3557—3563.
 - 53a. *Huang R. T. C., Wahn K., Klenk H.-D., Rott R.* (1980). Fusion between cell membrane and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus, *Virology*, **104**, 294—302.

54. Kiely M. L., McKnight G. S., Schimke R. T. (1976). Studies on the attachment of carbohydrate to ovalbumin nascent chains in hen oviduct, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5490.
55. Klenk H.-D., Wollert W., Rott R., Scholtissek C. (1974). Association of influenza virus proteins with cytoplasmic fractions, *Virology*, **57**, 28—41.
56. Kreil G. (1981). Transfer of proteins across membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 317—348.
57. Krystal M., Elliott R. M., Benz E. W., Young J. F., Palese P. (1982). Evolution of influenza A and B viruses: Conservation of structural features in the haemagglutinin genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4800—4804.
58. Krystal M., Young J. F., Palese P., Wilson I. A., Skehel J. J., Wiley D. C. (1983). Sequential mutation in haemagglutinins of influenza B virus isolates: Definition of antigenic domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4527—4531.
59. Laver W. G., Valentine R. C. (1969). Morphology of the isolated haemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus, *Virology*, **38**, 105.
60. Laver W. G., Air G. M., Dopheide T. A., Ward C. W. (1980). Amino acid sequence changes in the haemagglutinin of A/Hong Kong (H3N2) influenza virus during the period 1968—77, *Nature*, **283**, 454—457.
61. Leblond C. P., Bennett G. (1977). Role of the Golgi apparatus in terminal glycosylation. In: *International Cell Biology*, ed. by B. R. Brinkley and K. R. Porter, pp. 326—340, Rockefeller University Press, New York.
62. Lenard J., Compans R. W. (1974). The membrane structure of lipid-containing viruses, *Biochim. Biophys. Acta*, **334**, 51.
63. Lenz J., Crowther R., Straceski A., Hazeltine W. (1982). Nucleotide sequence of the AKV env gene, *J. Virol.* **42**, 519—529.
64. Maeda T., Ohnishi S. (1980). Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes, *FEBS Lett.*, **122**, 283—287.
65. Maeda T., Kawasaki K., Ohnishi S. (1981). Interaction of influenza virus haemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4133—4137.
66. Marsh M., Helenius A. (1980). Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus, *J. Mol. Biol.*, **142**, 439—454.
67. Marshall R. D. (1972). Glycoproteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 673.
68. Matlin K. S., Reggio H., Helenius A., Simons K. (1981). The infective entry of influenza virus into MCDK-cells, *J. Cell Biol.*, **91**, 601—613.
69. Matlin K. S., Reggio H., Simons K., Helenius A. (1982). The pathway of vesicular stomatitis entry leading to infection, *J. Mol. Biol.*, **156**, 609—631.
70. Meyer D. I., Krause E., Dobberstein B. (1982). Secretory protein translocation across membranes—the role of the "Docking Protein", *Nature*, **297**, 647—650.
71. Milstein K., Brownlee G. G., Harrison T. M., Matthews M. B. (1972). A possible precursor of immunoglobulin light chains, *Nature*, **239**, 117—120.
72. Min Jou W., Verhoeven M., Devos R., Saman E., Fang R., Huybrechts D., Fiers W., Threlfall G., Backer C., Carey N., Emtag S. (1980). Complete structure of the haemagglutinin gene from the human influenza A/Victoria/3/75 (H5N2) strain as determined from cloned DNA, *Cell*, **19**, 683—696.
73. Muller G. M., Shapira M., Arnon R. (1982). Antiinfluenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 569—573.
- 73a. Natali A., Oxford J. S., Schild G. C. (1981). *J. Hyg. Camb.*, **87**, 185.
74. Neurath A. R., Kent S. B. H., Strick N. (1982). Specificity of antibodies elicited by a synthetic peptide having a sequence in common with a fragment of a virus protein, the hepatitis B surface antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7871—7875.
75. Osterrieth P. (1968). Recherches sur la structure et la fonction des couches externes du virus de la forêt de la Semliki; modification de celles-ci par l'ac-

- tion de la caséine C. Ext. Mem. Soc. R. Sci. (Liege), [Ser. 5], 16, 1—127.
76. Porter A. G., Barber C., Casey N. H., Hallowell R. A., Threlfall G., Emtage J. S. (1979). Complete nucleotide sequence of an influenza virus haemagglutinin gene from cloned DNA, *Nature*, 282, 471—477.
 77. Rice C. M., Strauss J. H. (1981). Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus and deduced sequence of the encoded virus structural proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2062—2066.
 78. Richardson C. D., Scheid A., Choppin P. W. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of F₁ or HA₂ viral polypeptides, *Virology*, 105, 205—222.
 79. Rodriguez-Boulan E., Sabatini D. D. (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5071—5075.
 80. Rogers C. N., Paulson J., Daniels R. S., Douglas A., Wilson I. A., Wiley D. C., Skehel J. J. (1983). Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity, *Nature*, 304, 76—78.
 81. Rogers J., Early P., Carter C., Calame K., Bond M., Hood L., Wall R. (1980). Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin μ chain, *Cell*, 20, 303—312.
 82. Rose J. K., Welch W. J., Sefton B. M., Esch F. S., Ling N. C. (1980). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is anchored in the viral membrane by a hydrophobic domain near the COOH terminus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3884—3888.
 83. Roth M. G., Fitzpatrick J. P., Compans R. W. (1979). Polarity of influenza and vesicular stomatitis virus maturation in MDCK cells: lack of a requirement for glycosylation of viral glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 6430—6434.
 84. Scheid A., Choppin P. W. (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins, Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus, *Virology*, 57, 475—490.
 85. Scheid A., Choppin P. W. (1976). Protease activation mutants of Sendai virus. Activation of biological properties by specific proteases, *Virology*, 69, 265—277.
 86. Schmidt M. F. G., Bracha M., Schlessinger M. J. (1979). Evidence for covalent attachment of fatty acids to Sindbis virus glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1687—1691.
 87. Schulze I. T. (1970). The structure of influenza virus: 1. The polypeptides of the virion, *Virology*, 42, 890.
 88. Schulze I. T., Pons M. W., Hirst G. (1970). The RNA and proteins of influenza virus. In: *The Biology of Large RNA Viruses*, ed. by R. D. Barry and B. W. G. Mahy, pp. 324—346, Academic Press, New York.
 89. Sefton B. M., Wickus G. G., Burge B. (1973). Enzymatic iodination of Sindbis virus proteins, *J. Virol.*, 11, 730.
 90. Shinnick T. M., Lerner R. A., Sutcliffe J. G. (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus, *Nature*, 293, 543—548.
 91. Simons K., Garoff H., Helenius A. (1982). How an animal virus gets into and out of its host cell, *Sci. Am.*, 246, 58—66.
 92. Siskind G. W., Banaceraff B. (1969). Cell selection by antigen in the immune response, *Adv. Immunol.*, 10, 1.
 93. Skehel J. J., Waterfield M. D. (1975). Studies on the primary structure of the influenza virus haemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 93—97.
 94. Skehel J. J., Bayley P. M., Brown E. B., Martin S. R., Waterfield M. D., White J. M., Wilson I. A., Wiley D. C. (1982). Changes in the conformation of influenza virus haemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 968—972.

95. *Sleigh M. J., Both G. W., Brownlee G. G., Bender V. J., Moss B. A.* (1980). The haemagglutinin gene of influenza A virus: nucleotide sequence analysis of cloned DNA copies. In: *Structure and Variation in Influenza Virus*, ed. by W. G. Laver and G. M. Air, pp. 69—78. Elsevier-North Holland, New York.
96. *Sleigh M. J., Both G. W., Underwood P. A., Bender V. J.* (1981). Antigenic drift in the haemagglutinin of the Hong Kong influenza subtype: correlation of amino acid changes with alterations in viral antigenicity, *J. Virol.*, **37**, 845—853.
97. *Springer T., Strominger J., Mann D.* (1974). Partial purification of detergent-soluble HL-A antigen and its cleavage by Papain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1539—1543.
98. *Stone D. K., Xie X.-S., Racker E.* (1983). An ATP-driven proton pump in clathrin-coated vesicles, *J. Biol. Chem.*, **258**, 4059d—4062.
99. *Strauss E. G., Strauss J. H.* (1977). Togaviruses. In: *The Molecular Biology of Animal Viruses*, Vol. 1, ed. by D. Nayak, pp. 111—166, Marcel Dekker, New York.
100. *Strittmater P., Velick S. F.* (1956). The isolation and properties of microsomal cytochrome, *J. Biol. Chem.*, **221**, 253.
101. *Sutcliffe J. G., Shinnick T. M., Green N., Liu F.-T., Niman H. L., Lerner R. A.* (1980). Chemical synthesis of a polypeptide predicted from nucleotide sequence allows detection of a new retroviral gene product, *Nature*, **287**, 801—805.
102. *Tokuyasu K., Singer S. J.* (1981). Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1746—1750.
103. *Tomita M., Marchesi V. T.* (1975). Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2964—2968.
104. *Tyrrell D. A. J., Smith J. W. G.* (1979). Vaccination against influenza A, *Br. Med. Bull.*, **35**, 77—85.
105. *Verhoeyen M., Fang R., Min Jou W., Devos R., Huylebroeck D., Saman F., Fiers W.* (1980). Antigenic drift between the haemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68, *Nature*, **286**, 771—776.
106. *von Bonsdorff C.-H., Harrison S. C.* (1975). Sindbis virus glycoproteins form a regular icosahedral surface lattice, *J. Virol.*, **16**, 141.
107. *von Bonsdorff C.-H., Harrison S. C.* (1978). Hexagonal glycoprotein arrays from Sindbis virus membranes, *J. Virol.*, **28**, 578—583.
108. *von Bonsdorff C.-H., Petterson R.* (1975). Surface structure of Uukuniemi virus, *J. Virol.*, **16**, 1296—1307.
109. *Waechter C. J., Lennarz W. J.* (1976). The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 95—112.
110. *Walter G., Scheidtmann K.-H., Carbone A., Laudano A., Doolittle R. F.* (1980). Antibodies specific for the carboxy- and amino-terminal regions of Simian virus 40 large tumor antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5197—5200.
111. *Walter P., Blobel G.* (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein, *J. Cell Biol.*, **91**, 551—556.
112. *Walter P., Blobel G.* (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and KL-site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes, *J. Cell Biol.*, **91**, 557—561.
113. *Walter P., Blobel G.* (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum, *Nature*, **299**, 691—698.

114. Walter P., Ibrahimi I., Blobel G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein, *J. Cell Biol.*, **91**, 545—550.
115. Ward C. W. (1981). Structure of the influenza virus hemagglutinin, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **94/95**, 1—74.
116. Ward C. W., Dopheide T. A. (1980). Completion of the amino acid sequence of a Hong Kong influenza haemagglutinin heavy chain; Sequence of cyano-gen bromide fragment CNI, *Virology*, **103**, 37—53.
117. Ward C. W., Dopheide T. A. (1980). Structural studies of a Hong Kong influenza haemagglutinin. The structure of the light chain and the arrangement of the disulphide bonds. In: *Structure and Variation in Influenza Virus*, ed. by W. G. Laver and G. M. Air, pp. 21—38, Elsevier-North Holland, New York.
118. Ward C. W., Murray J. M., Roxburg C. M., Jackson D. S. (1983). Short communications: Chemical and antigenic characterization of the carbohydrate site chains of an Asian (N2) influenza virus neuraminidase, *Virology*, **126**, 370—375.
119. Waterson A. P., Hurell J. M. W., Jensen K. E. (1963). The fine structure of influenza A, B, and C viruses, *Arch. Ges. Virusforsch.*, **12**, 487—495.
120. Webster C. G., Laver W. G. (1980). Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus haemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance, *Virology*, **104**, 139—148.
121. White J., Helenius A., Gething M. J. (1982). Haemagglutinin of influenza expressed from a cloned gene promotes membrane fusion, *Nature*, **300**, 658—659.
122. White J., Helenius A., Kartenbeck J. (1983). Membrane fusion activity of influenza virus, *EMBO J.*, **1**, 217—222.
123. White J., Kartenbeck J., Helenius A. (1981). Fusion of Semliki Forest virus with the plasma membrane can be induced by low pH, *J. Cell. Biol.*, **87**, 264—272.
124. White J., Killian M., Helenius A. (1983). Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses, *Quart. Rev. Biophys.*, **16**, 151—195.
125. White J., Matlin K., Helenius A. (1981). Cell fusion by Semliki Forest, influenza and vesicular stomatitis virus, *J. Cell. Biol.*, **89**, 674—679.
126. Wiley D. C., von Bonsdorff C.-H. (1978). Three-dimensional crystals of the lipid enveloped Semliki Forest virus, *J. Mol. Biol.*, **120**, 375—379.
127. Wiley D. C., Skehel J. J., Waterfield M. D. (1977). Evidence from studies with cross-linking reagents that the influenza haemagglutinin is a trimer, *Virology*, **79**, 446—448.
128. Wiley D. C., Wilson I. A., Skehel J. J. (1981). Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation, *Nature*, **289**, 373—378.
129. Wilson I. A., Skehel J. J., Wiley D. C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, *Nature*, **289**, 366—373.
130. Winter G., Fields S., Brownlee G. G. (1981). Nucleotide sequence of the haemagglutinin gene of a human influenza virus H₁ subtype, *Nature*, **292**, 72—75.
131. World Health Organization (1971). A revised system of nomenclature for influenza viruses, *Bull. WHO*, **45**, 119—124.
132. Wrigley N. G., Skehel J. J., Charlwood P. A., Brand C. M. (1973). The size and shape of influenza virus neuraminidase, *Virology*, **51**, 525—529.
133. Zwizinski C., Wickner W. (1980). Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **255**, 7973—7977.

Размножение вирусов: общие представления

Бернард Ройзман¹

Поиски этиологических агентов инфекционных заболеваний увенчались открытием сотен вирусов. Патологические эффекты при вирусных заболеваниях складываются из взаимодействия нескольких факторов: а) токсического воздействия продуктов вирусных генов на метаболизм зараженных клеток; б) реакции хозяина на экспрессию вирусных генов в зараженных клетках; в) модификации экспрессии генов хозяина в результате их структурного или функционального взаимодействия с генетическим материалом вируса. В большинстве случаев симптомы острых вирусных заболеваний могут быть непосредственно связаны с разрушением клеток инфицирующим их вирусом. Ключом к пониманию размножения вирусов является ряд положений и определений.

1. Для того чтобы вирус мог размножиться, он должен вначале заразить клетку. Спектр хозяев определяется как типами клеток, так и видами животных, которых он может заражать и в которых он способен размножаться. Спектр хозяев разных вирусов значительно варьирует. Одни вирусы имеют широкий спектр хозяев, другие заражают лишь клетки одного типа определенных видов животных. Способность клетки или животного заражаться называют восприимчивостью. Факторы, определяющие спектр хозяев и восприимчивость, обсуждаются в следующем разделе. Когда человек вступает в контакт с вирусом, в спектр хозяев которого он входит, немедленно заражаются лишь восприимчивые клетки, находящиеся у входных ворот инфекции. Однако для клинического проявления инфекции заражения этих клеток может оказаться недостаточно. Как правило, болезнь возникает вследствие заражения клеток-мишеней (например, клеток центральной нервной системы) вирусом, размножившимся в чувствительных клетках в месте проникновения инфекции. Во многих случаях (например, респираторные инфекции, инфек-

¹ *Bernard Roizman*, Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, Illinois 60627.

ции гениталий вирусом простого герпеса) клетки-мишени располагаются у входных ворот инфекции.

2. В начале инфекции вирус вводит в клетку свой генетический материал — РНК или ДНК, часто вместе с необходимыми белками. Размеры, состав и генная организация вирусных геномов очень сильно варьируют. Вирусы, по-видимому, эволюционируют разными путями, и не существует какого-либо одного преобладающего способа их репликации. Здесь следует подчеркнуть два положения. Во-первых, способность вирусов к размножению и судьба зараженных клеток зависят от синтеза и функции продуктов вирусных генов — белков. Нигде корреляция между структурой и функцией — в данном случае между составом и расположением генетического материала и механизмом экспрессии вирусных генов — не является столь очевидной, как у вирусов. Различие механизмов, с помощью которых вирусы обеспечивают синтез своих белков, отражено в их генетической структуре, но далеко не всегда может быть выведено из нее. Во-вторых, хотя вирусы значительно различаются по числу содержащихся в них генов, можно сказать, что все вирусы кодируют функции трех типов, которые выражаются специфическими для них белками. Вирусные белки обеспечивают: а) репликацию вирусного генома, б) упаковку генома в вирусные частицы (вирионы) и в) изменение структуры и (или) функции зараженных клеток.

Стратегия, применяемая вирусами для обеспечения этих функций, варьирует. Иногда (паповавирусы) вирусные белки просто помогают ферментам клетки хозяина реплицировать вирусный геном. В большинстве случаев (пикорнавирусы, герпес-вирусы, реовирусы) вирусные белки сами обеспечивают репликацию вирусного генома, но даже наиболее независимые вирусы используют при этом по крайней мере несколько белков хозяина. Во всех случаях именно вирусные белки ответственны за упаковку генома в вирионы, даже если белки хозяина и полиамины связываются с вирусным геномом (например, у паповавирусов) до или во время формирования вирусных частиц. Последствия размножения вируса в клетке могут варьировать от гибели клетки до незначительных, но потенциально очень важных изменений ее функции и антигенной специфичности.

3. Наши знания относительно циклов репродукции вирусов получены главным образом из анализа событий, происходящих в синхронно инфицированной культуре клеток. О вирусах, которые не удается вырастить в культуре клеток, мало что известно; в будущем, вероятно, решению этого вопроса поможет молекулярное клонирование. Цикл репродукции всех вирусов имеет несколько общих черт (рис. 5.1). Вскоре после заражения и в течение нескольких часов после него удается обнаружить лишь



Рис. 5.1. Цикл репродукции вирусов, заражающих клетки эукариот. Время цикла различается для разных вирусов; оно может колебаться от 8 ч (вирус полиомиелита) до более чем 40 ч (цитомегаловирус).

небольшое количество родительского вируса. Этот период известен как *эклипсная фаза*; в это время геном вируса взаимодействует с хозяйским или вирусным аппаратом, необходимым для его экспрессии, но численность потомства вируса еще не превышает фоновую. Затем следует интервал, во время которого вирионы потомства накапливаются внутри или вне клетки с экспоненциальной скоростью. Этот период известен как *фаза созревания*. Через несколько часов в клетках, зараженных литическими вирусами, снижается метаболическая активность и они теряют структурную целостность. Клетки, зараженные другими вирусами, могут продолжать синтез вирионов неограниченное время. Цикл репродукции вирусов варьирует от 6—8 ч (пикорнавирусы) до 40 ч и более (некоторые герпесвирусы). Урожай вируса в расчете на одну клетку широко варьирует и в случае вируса полиомиелита, например может превышать 100 000 частиц.

4. Заражение восприимчивых клеток не означает, что неизбежно будут происходить размножение вируса и накопление его потомства. Эта концепция, одна из важнейших в вирусологии, возникла в последнее десятилетие и ее следует рассмотреть детальнее. Инфекция восприимчивых клеток может быть продуктивной, ограниченной и абортивной. *Продуктивная инфекция* происходит в *пермиссивных* клетках и характеризуется продукцией инфекционного потомства. *Абортивная инфекция* может наступить в силу двух обстоятельств. Несмотря на восприимчивость к заражению, клетки могут оказаться *непермиссивными*, так как, чаще всего по неизвестным причинам, в них способны экспрессироваться лишь некоторые вирусные гены. Абортивная инфекция может быть также результатом заражения как пермиссивных, так и непермиссивных клеток *дефектными* вирусами,

у которых отсутствует полный набор вирусных генов. Наконец, клетки могут быть только временно перmissive, вследствие чего вирус либо сохраняется в клетках до момента, когда они становятся перmissive, либо в любой данный момент вирусное потомство образуется только в немногих клетках популяции. Этот вид инфекции одними исследователями был определен как *рестриктивный* (restrictive), другими — как ограниченный (*restricting*). Данная классификация важна; ее значение обусловлено тем, что цитолитические вирусы, как правило разрушающие перmissive клетки во время продуктивной инфекции, могут просто повреждать, но не разрушать abortивно зараженные перmissive и неперmissive клетки. Вследствие повреждения может происходить такая экспрессия хозяйских функций, в результате которой клетка превращается из нормальной в злокачественную. Дополнительным следствием ограниченной и abortивной инфекций является *персистенция* (сохранение в клетке) вирусного генома.

Начало инфекции

Чтобы заразить клетку, вирион должен связаться с клеточной поверхностью, проникнуть в клетку и «раздеться» до такой степени, чтобы его геном стал доступен для вирусного или хозяйского аппарата, обеспечивающего транскрипцию или трансляцию.

Прикрепление

Прикрепление представляет собой специфическое связывание вирионного белка (*антирецептора*) с элементом клеточной поверхности (*рецептором*). Классическим примером антирецептора является гемагглютинин вируса гриппа (ортомиксовируса). Антирецепторы распределены по поверхности вирусов, заражающих клетки человека и животных. Сложные вирусы, такие как вирус осповакцины (поксвирус) и вирус простого герпеса (герпесвирус), могут иметь антирецепторные молекулы нескольких видов. Более того, молекулы антирецепторов могут иметь несколько доменов, каждый из которых взаимодействует с определенным рецептором. Мутации генов, кодирующих антирецепторы, иногда ведут к потере их способности взаимодействовать с рецепторами.

Идентифицированные до настоящего времени рецепторы относятся к гликопротеинам. Связывание требует определенной концентрации ионов в окружающей среде, достаточной для уменьшения электростатического отталкивания, но от темпера-

туры и энергии оно мало зависит. Чувствительность клеток ограничена доступностью рецепторов, и не все клетки в восприимчивом организме экспрессируют рецепторы. Почечные клетки человека в структуре почек не имеют рецепторов для вируса полиомиелита, но при культивировании этих клеток *in vitro* рецепторы появляются. Восприимчивость клеток не следует путать с перmissивностью; так, клетки кур не восприимчивы к вирусу полиомиелита, поскольку у них нет рецепторов для связывания с вирионами. Однако они полностью перmissивны в отношении этого вируса, так как они продуцируют вирус после заражения их интактной РНК, экстрагированной из вирусных частиц.

Очень часто связывание вирусов с клетками ведет к необратимым изменениям структуры вириона. В некоторых случаях, когда проникновения не происходит, вирус может отделиться от клетки и вновь адсорбироваться на другой. К вирусам последней категории относятся ортомиксовирусы и парамиксовирусы, несущие на своей поверхности *нейраминидазу*. Эти вирусы способны отделяться от своих рецепторов в результате отщепления нейраминовой кислоты от полисахаридной цепи рецепторов.

Проникновение

Проникновение является процессом, зависимым от энергии, и происходит почти мгновенно после прикрепления в результате одного из трех событий: а) перемещения всего вируса через плазматическую мембрану; б) пиноцитоза вирусных частиц, в результате которого они накапливаются внутри цитоплазматических вакуолей, и в) слияния плазматической мембраны с оболочкой вириона. Вирусы без оболочек проникают в клетку с помощью первых двух механизмов. Известно, например, что в процессе адсорбции вируса полиомиелита на клетке его капсид модифицируется и теряет свою структурную целостность, а комплекс РНК — белок переносится в цитоплазму. Ортомиксовирусы, парамиксовирусы и герпесвирусы служат примерами вирусов, проникающих в результате слияния их оболочек с плазматической мембраной. В этих случаях оболочка вируса остается на плазматической мембране, в то время как внутреннее содержимое вводится в цитоплазму. Слияние оболочки вируса с плазматической мембраной требует участия специфических белков этой оболочки.

Разделение

Разделение — общепринятый термин, применяемый к происходящим после проникновения событиям, в результате которых вирусный геном получает возможность экспрессировать свои

функции. В случае папова-, адено- и герпесвирусов, вероятнее всего, клеточные ферменты дезагрегируют капсид и к моменту экспрессии вирусных функций от вирусной частицы остаются только ДНК или комплекс ДНК—белок. При реовирусной инфекции в клетках удаляется только часть капсида, и, несмотря на то что вирусный геном так и не освобождается из капсида полностью, он экспрессирует все свои функции. Поксвирусы раздеваются в две стадии: на первой ферменты хозяина удаляют наружное покрытие, а на второй для освобождения вирусной ДНК из сердцевины требуется участие продуктов вирусных генов, синтезированных после заражения.

Стратегия размножения вируса

Требования и ограничения

В ходе эволюции вирусов сложилось несколько стратегий, обеспечивающих: а) организацию вирусных генов и их кодирующую функцию, б) экспрессию вирусных генов, в) репликацию вирусных геномов и г) сборку и созревание вирусного потомства. Прежде чем мы рассмотрим каждое из этих положений в деталях, стоит напомнить, что ключевым моментом в репликации вирусов является использование для синтеза вирусных белков хозяйских структур, синтезирующих белки клетки. Независимо от размеров, состава и организации своего генома вирус должен предоставить белоксинтезирующему аппарату эукариотической клетки информационную РНК, которую клетка должна распознать и транслировать. В этом отношении клетка навязывает вирусу два ограничения. Во-первых, клетка синтезирует в ядре свою собственную мРНК путем транскрипции своей ДНК и последующего посттранскрипционного процессинга транскрипта. Поэтому в клетке: а) ни в ядре, ни в цитоплазме нет ферментов, необходимых для транскрипции мРНК с вирусного РНК-генома, и б) в цитоплазме нет ферментов, способных транскрибировать вирусную ДНК. В связи с этим клеточную транскриптазу для синтеза вирусных мРНК могут использовать только вирусы, содержащие ДНК и способные проникать в ядро. Все другие вирусы вынуждены создавать собственные ферменты для синтеза мРНК. Второе ограничение состоит в том, что синтезирующий аппарат эукариотических клеток приспособлен только для трансляции моноцистронных мРНК, так как он не распознает внутренних участков инициации в мРНК. В результате вирусы вынуждены синтезировать либо отдельные мРНК для каждого гена (функционально моноцистронная мРНК), либо мРНК, включающую несколько генов и кодирующую большой «полипротеин», который затем разрезается на индивидуальные белки.

Кодирование и организация вирусного генома

Вирусные гены кодированы либо в РНК, либо в ДНК, которые могут быть либо одно-, либо двухцепочечными. Кроме того, геномы могут быть либо *моноклеточными*, когда все гены вируса содержатся в одной хромосоме, либо состоять из *раздельных блоков*, когда все гены вируса распределены среди нескольких хромосом, которые все вместе и составляют геном вируса. Во избежание ошибок мы обозначаем как «геномную» только нуклеиновую кислоту, которая заключена в вирионах. Среди РНК-содержащих вирусов реовирусы представляют собой наиболее хорошо изученное семейство, содержащее двухцепочечный геном; кроме того, этот геном принадлежит к сегментированным, так как он состоит из 10 сегментов, или хромосом. Геномы одноцепочечных РНК-содержащих вирусов могут быть либо моноклеточными (пикорна-, тога-, парамиксо-, рабдо-, корона-, ретровирусы), либо сегментированными (ортомиксо-, арена- и буньявирусы). Все РНК-геномы относятся к линейным молекулам. Некоторые из них, например геномы пикорнавирусов, содержат на 5'-конце РНК ковалентно связанные полипептиды или аминокислоты.

Все известные ДНК-содержащие вирусы, заражающие позвоночных, имеют моноклеточный геном. За исключением геномов парвовирусов, все они — полностью или частично — двухцепочечные. Отдельные вирионы парвовирусов содержат линейную одноцепочечную ДНК; в некоторых родах (например, у аденоассоциированных вирусов) комплементарные цепи ДНК находятся в разных частицах. ДНК паповавирусов — кольцевая и сверхспиральная, в то время как ДНК герпесвирусов, аденовирусов, а также поксвирусов — линейная. ДНК вируса гепатита В представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу, на обеих цепях которой в разных областях обнаружены большой и малый одноцепочечные участки.

Экспрессия и репликация вирусного генома

Для удобства сначала лучше обсудить РНК-содержащие вирусы, фокусируя внимание прежде всего на функции геномной РНК.

Вирусы, содержащие одноцепочечную РНК

Вирусы с одноцепочечной РНК можно подразделить на три группы. В первую группу входят пикорнавирусы и тогавирусы. Их геномы выполняют две функции (рис. 5.2 и 5.3). Во-первых, они функционируют как мРНК. Вирусы, геном которых может служить в качестве мРНК, принято называть вирусами с позитивным геномом. РНК пикорнавирусов после проникновения в

Рис. 5.2. Размножение пикорнавирусов.

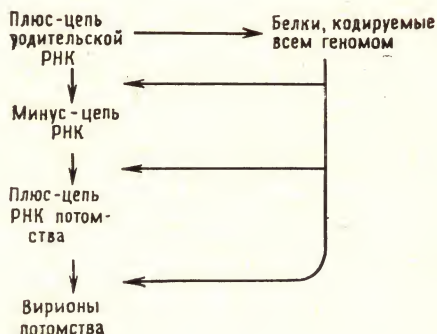
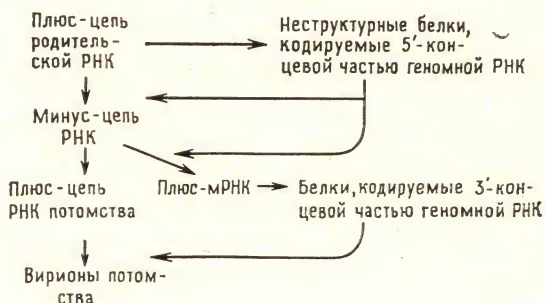


Рис. 5.3. Размножение тогавирусов.



клетку связывается с рибосомами и полностью транслируется (рис. 5.2). Затем продукт этой трансляции — полипротеин — расщепляется. Во-вторых, геномные РНК выполняют функцию матрицы для синтеза на ней комплементарных минус-цепей при участии полимеразы, появившейся в результате расщепления полипротеина. На этих минус-цепях синтезируются новые плюс-цепи, которые могут использоваться в качестве а) мРНК, б) матриц для синтеза новых минус-цепей и в) составной части вирусных частиц потомства.

Тогавирусы и ряд других вирусов с позитивным геномом отличаются от пикорнавирусов в одном отношении (рис. 5.3): для трансляции в первом цикле синтеза белков доступна только часть их геномной РНК. Вероятной функцией образующихся при этом белков является способность транскрибировать геномную РНК. Они осуществляют синтез минус-цепи, которая в свою очередь служит матрицей для синтеза двух различных по размеру классов молекул плюс-РНК. В клетках, зараженных тогавирусами, РНК первого класса представлены небольшими молекулами мРНК, фланкирующими участок геномной РНК, который не транслировался в первом цикле. Образующиеся на них полипротеины расщепляются на белки, которые играют структурную

роль в вирионах. Плюс-РНК второго класса состоит из полноразмерных цепей, которые упаковываются в вирионы. В клетках, зараженных коронавирусами, синтезируются несколько видов мРНК.

Главным в репликации вирусов с позитивным геномом является способность геномной РНК служить в качестве мРНК после заражения. Это имеет двоякие последствия. Во-первых, ферменты, ответственные за репликацию генома, синтезируются после заражения, и нет необходимости в их внесении в зараженную клетку вместе с вирионом. Вот почему «голая» РНК, экстрагированная из вирионов, инфекционна. Во-вторых, так как все позитивные геномы относятся к моноклеточным и все их гены сосредоточены в одной хромосоме, первичный продукт трансляции обеих РНК (как геномной, так и мРНК) обязательно представляет собой единый белок. Продукты трансляции пикорнавирусов и тогавирусов должны быть затем расщеплены на индивидуальные белки, которые и обнаруживаются в вирионе или в зараженной клетке.

Ортомиксовирусы, парамиксовирусы, буньявирусы, аренавирусы и рабдовирусы составляют вторую группу одноцепочечных РНК-содержащих вирусов, называемых вирусами с негативным геномом. Для них характерно то, что геномная РНК выполняет две матричные функции: во-первых, для транскрипции и, во-вторых, для репликации. В связи с тем что для синтеза мРНК должен транскрибироваться вирусный геном, а в клетках соответствующие ферменты отсутствуют, все вирусы с негативным геномом содержат в вирионе кроме вирусного генома транскриптазу. Транскрипция вирусного генома — первое событие после проникновения вируса в клетку, в результате которого накапливаются функционально активные моноклеточные мРНК [позитивные, или плюс-цепи], кодирующие один белок. Репликацию начинают новосинтезированные вирусные белки, катализирующие образование полной плюс-цепи, которая служит матрицей для синтеза геномной минус-РНК (рис. 5.4).

Главное в репликации вирусов с негативным геномом заключается в том, что геномная РНК функционирует как матрица и для транскрипции, и для репликации. Отсюда следует, что, во-первых, вирус должен внести с собой в зараженную клетку транскриптазу; во-вторых, «голая» РНК, экстрагированная из вирионов, неинфекционна; в-третьих, синтезируемые мРНК имеют длину одного гена, они кодируют один белок — единственный полипептид. Однако присутствие сигналов сплайсинга в определенных (не разбросанных произвольно по гену) участках может обеспечить формирование нескольких мРНК (каждая из которых кодирует особый белок) с одного и того же участка генома. Следовательно, плюс-транскрипт, функционирующий в качестве

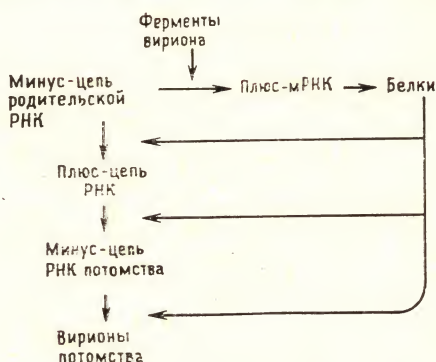


Рис. 5.4. Размножение ортомиксовирусов и парамиксовирусов.

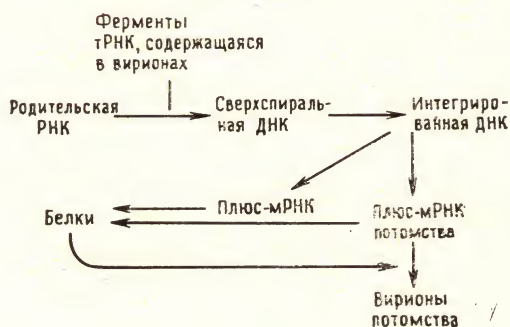


Рис. 5.5. Размножение ретровирусов.

мРНК, отличается от плюс-РНК, служащей матрицей для вирусного потомства, хотя и первый, и второй синтезируются на геномной РНК. Преимущества транскрипции многих мРНК с одного и того же участка (в результате сплайсинга) очевидны. Моноцистронная мРНК выгодна потому, что вирус при этом может контролировать относительные количества отдельных белков, и нет необходимости их синтеза в эквимоларных количествах.

Ретровирусы входят в третью группу РНК-содержащих вирусов (рис. 5.5). Характерно, что геномы ретровирусов монолитны, но имеют диплоидную структуру, и обе цепи либо частично соединены водородными связями друг с другом, либо спарены неизвестным до настоящего времени образом. Единственная известная функция геномной РНК — матричная функция для синтеза вирусной ДНК. Поскольку эукариотические клетки не имеют для этого соответствующих ферментов, вирион кроме генома содержит еще и РНК-зависимую ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу¹), а также смесь тРНК хозяина, одна из которых

¹ В русской литературе принят также термин «ревертаза», предложенный В. А. Энгельгардтом. — *Прим. ред.*

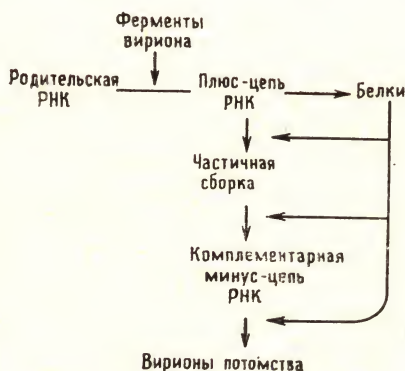


Рис. 5.6. Размножение реовирусов.

служит в качестве затравки. В цикле репродукции можно выделить следующие ключевые ступени: а) связывание комплекса тРНК — обратная транскриптаза с геномной РНК; б) синтез ДНК-копии, комплементарной по отношению к РНК, с переходом полимеразы с одной молекулы РНК-матрицы на другую, что приводит к образованию кольцевой одноцепочечной молекулы ДНК, связанной водородными связями с линейной геномной РНК; в) расщепление геномной РНК нуклеазой, атакующей только РНК в ДНК—РНК-гибридах (рибонуклеазой Н, также содержащейся в вирионе), и г) синтез комплементарной копии вирусной ДНК. Затем кольцевая двухцепочечная ДНК перемещается в ядро, где интегрирует с геномом хозяина, но последующая экспрессия вирусных генов не обязательна. Если экспрессия происходит, то интегрированная вирусная ДНК транскрибируется транскриптазой клетки-хозяина. Продуктами транскрипции являются молекулы РНК, как равные по длине молекуле генома, так и более короткие мРНК-транскрипты нескольких соседних генов, которые транслируются с образованием полипротеинов. Полипротеины затем расщепляются на отдельные вирусные белки. В состав вирионов включаются только транскрипты, содержащие весь геном.

Вирусы, содержащие двухцепочечную РНК

Двухцепочечный сегментированный геном реовируса транскрибируется вирионной полимеразой внутри частично «раздетого» капсида, через открытые вершины которого выходят 10 мРНК — плюс-транскрипты 10 генов (рис. 5.6). Молекулы мРНК выполняют две функции. Во-первых они транслируются, обеспечивая синтез вирусных белков, и, во-вторых, они включаются (по одной молекуле мРНК каждого из 10 генов) в состав

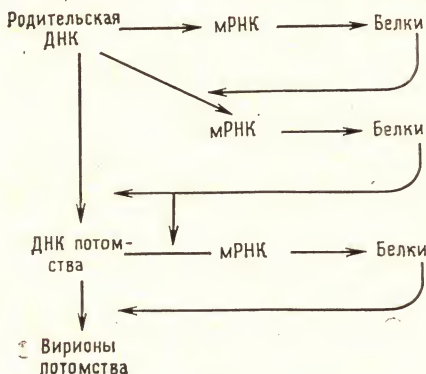


Рис. 5.7. Размножение герпесвирусов (вируса простого герпеса).

частиц-предшественниц. Каждая мРНК служит в этих частицах матрицей для синтеза комплементарной цепи, что ведет к образованию двухцепочечных сегментов генома.

Геномы ДНК-содержащих вирусов

Геномы ДНК-содержащих вирусов можно разделить на четыре группы. Геномы папова-, адено- и герпесвирусов транскрибируются и реплицируются в ядре, поэтому они могут использовать для синтеза мРНК ферменты транскрипции хозяина. Этим объясняется инфекционность ДНК указанных вирусов. У паповавирусов транскрипционная программа состоит по крайней мере из двух циклов, а у герпес- (рис. 5.7) и аденовирусов по крайней мере из трех. В каждом случае структурные или вирионные полипептиды синтезируются на мРНК, появляющейся в последнем цикле транскрипции.

Поксвирусы составляют вторую группу. Хотя ДНК поксвирусов удается обнаружить в ядре, по крайней мере начальные события транскрипции и большая часть остальных событий цикла репродукции происходят в цитоплазме. Начальная транскрипция происходит в сердцевине вириона. Многие вопросы, касающиеся цикла репродукции этого вируса, еще не выяснены.

Парвовирусы входят в третью группу. К единственным вирусам этой группы, о которых доступна какая-то информация и которые способны заражать человека, относятся дефектные аденоассоциированные вирусы, нуждающиеся для своего размножения в аденовирусах или в вирусе простого герпеса в качестве вирусов-помощников. Для их размножения требуются синтез в ядре клетки ДНК-цепи, комплементарной одноцепочечной геномной ДНК, и последующая транскрипция генома.

Вирус гепатита В является представителем четвертой группы (рис. 5.8). ДНК этого вируса сначала достраивается с помощью

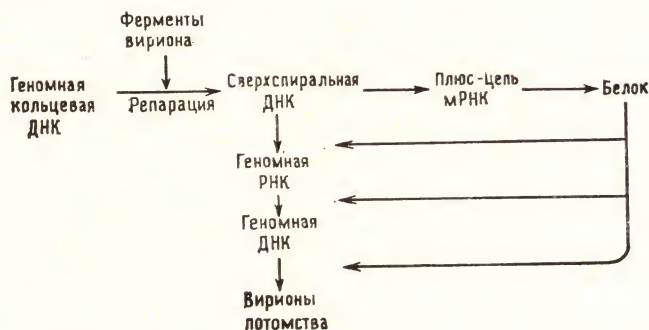


Рис. 5.8. Размножение вируса гепатита В.

ДНК-полимеразы, включенной в вирион, и превращается в сверхспиральную молекулу. Эта молекула транскрибируется с образованием молекул РНК двух классов — мРНК, кодирующей белки, и геномной РНК, которую затем транскрибирует обратная транскриптаза, синтезируя геномную ДНК.

Сборка, созревание и выход вирусов из зараженных клеток

В процессе эволюции у вирусов выработались две фундаментальные стратегии, используемые ими при сборке, созревании и выходе вируса из зараженной клетки. Первая, свойственная пикорнавирусам, реовирусам, паповавирусам, парвовирусам, аденовирусам и поксвирусам, заключается в осуществлении сборки и созревания внутри клеток. В случае пикорнавирусов 60 копий каждого из вирионных белков, обозначаемых VP0, VP1, VP3, собираются в цитоплазме в *прокапсид*. Затем вирусная РНК свертывается вокруг прокапсида, и в это время VP0 расщепляется на два полипептида VP2 и VP4. Возможно, расщепление вызывает перестройку капсида в термодинамически стабильную структуру, в которой РНК защищена от нуклеаз. Поксвирусы и реовирусы также собираются в цитоплазме. В противоположность этому сборка аденовирусов, паповавирусов и парвовирусов происходит в ядре. Дезинтеграция зараженных клеток — непременное условие для выхода из них всех вирусов, осуществляющих сборку и приобретающих инфекционность внутриклеточно. Накоплены данные, свидетельствующие о том, что угнетение метаболизма макромолекул и последующая дезинтеграция зараженной клетки осуществляются структурными белками этих вирусов.

Другая стратегия, используемая вирусами, имеющими оболочку, среди которых можно назвать все РНК-содержащие вирусы с негативным геномом, тогавирусы и ретровирусы, состоит в

сочетании последней ступени сборки вириона и выхода его из зараженной клетки. При этом с внутренней и с наружной стороны в плазматические мембраны встраиваются вирионные белки; часть этих белков, находящаяся с наружной стороны мембраны, гликозилирована. Мембранные белки вируса агрегируют с образованием скоплений и вытесняют при этом мембранные белки хозяина. Вирусные нуклеокапсиды связываются с вирус-специфическими белками, выстилающими цитоплазматическую поверхность этих скоплений, или с цитоплазматическими доменами вирусных гликопротеинов (тогавирусы) и обертываются этими участками мембраны. Во время этого процесса вновь образующийся вирион «выпячивается», или «отпочковывается», во внешнюю среду, окружающую клетку. В некоторых случаях (например, у орто- и парамиксовирусов) во время или после выпячивания происходит разрезание и структурная перестройка одного из поверхностных белков, что наделяет вновь сформировавшийся вирион способностью заражать клетки. Сборка и созревание вирионов путем отпочковывания от плазматической мембраны клетки представляют собой наиболее эффективный механизм выхода, поскольку он не зависит от дезинтеграции зараженных клеток. При этом изменения метаболизма клетки хозяина и ее целостности под влиянием вирусов, созревающих и выходящих из клетки указанным образом, значительно варьируют. По воздействию на клетки вирусы можно расположить в ряд от цитолитических (тогавирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы) до фактически не лизирующих клетку (ретровирусы). Однако в результате встраивания вирусных гликопротеинов в поверхность клетки перечисленные вирусы придают клетке новую антигенную специфичность и зараженная клетка может стать и становится мишенью для иммунных механизмов хозяина.

Нуклеокапсид вируса герпеса собирается в ядре. В отличие от других вирусов с оболочкой одевание и созревание происходят у него на внутренней поверхности ядерной мембраны. Одетые вирусы накапливаются в пространстве между внутренним и внешним слоем ядерной мембраны, в цистернах цитоплазматического ретикулума, а также в везикулах, несущих вирус к поверхности клетки. Таким образом одетые вирусы надежно защищены от контакта с цитоплазмой. Вирусы герпеса являются цитолитическими и неизменно разрушают клетки, в которых они размножаются. Подобно другим вирусам с оболочкой, эти вирусы сообщают зараженным клеткам новые антигенные свойства.

В разделах, посвященных отдельным группам вирусов, основное внимание фокусируется на механизмах применяемых ими стратегий размножения.

Формирование и репликация дефектных вирусных геномов

Джон Дж. Холланд¹

Природа дефектных вирусных геномов

Дефектный вирусный геном — это любой вирусный геном, в котором один или несколько генов утратили функцию, необходимую для автономной репликации вируса. Все вирусы в определенном смысле дефектны, поскольку для репликации они нуждаются в живой клетке хозяина и в клеточных факторах. Однако дефектные вирусы нуждаются также для репликации и (или) созревания в помощи другого вирусного генома или гена (генов). Вирусные геномы часто становятся настолько дефектными, что теряют свои биологические функции. Однако ниже мы рассмотрим только дефектные вирусные геномы, которые сохраняют биологическую активность. Они составляют следующие пять классов: 1) дефектные геномы, зависящие от вирусов-помощников; 2) дефектные вирусные геномы, интегрированные с хромосомой клетки-хозяина; 3) вирусы-сателлиты; 4) псевдовирioны; 5) условно дефектные геномы. Наибольшее биологическое значение имеют зависящие от помощников и интегрированные дефектные вирусные геномы.

Дефектные геномы, зависящие от вируса-помощника

Сюда входят дефектные интерферирующие (ДИ) вирусы, обычно называемые ДИ-частицами, которые представляют собой субгеномные делеционные мутанты, потерявшие существенный участок генома родительского вируса. Величина утраченной части генома может варьировать от небольшой до более чем 90% генома. ДИ-частицы становятся при этом зависимыми от вируса-помощника. Для восстановления утраченных генетических функций, необходимых для репликации, они требуют одновременного заражения клеток хозяина родственным вирусом-помощником. Кроме того, ДИ-частицы угнетают репликацию ин-

¹ John J. Holland, University of California at San Diego, La Jolla, California 92093.

фекционного вируса-помощника, используя продукты его генов для своей репликации и лишая тем самым вирус-помощник возможности утилизировать их для собственной репликации.

В 1943 г. Хенле и Хенле [55] впервые наблюдали эффект ДИ-частиц в неразведенном вирусном материале из куриных эмбрионов, однако они приписали интерферирующую активность инактивированному инфекционному вирусу. В 1954 г. фон Магнус тщательно изучил этот феномен и показал, что «неполные» частицы вируса гриппа, сохранившие гемагглютинирующую активность, но утратившие инфекционность, способны интерферировать с инфекционным вирусом гриппа [152]. В 1959 г. Купер и Беллетт [14, 32] показали, что пассирование неразведенного вируса везикулярного стоматита (VSV) ведет к появлению сходных, передаваемых при пассировании, осаждаемых интерферирующих частиц. Наконец, в 1964 г. Хакетт [53] с помощью электронной микроскопии показал, что палочковидные ДИ-частицы VSV короче стандартных инфекционных частиц VSV. Вскоре после этого Хуанг и др. [72], Крик и др. [33] и Хакетт и др. [54] центрифугированием в градиенте плотности сахарозы физически отделили ДИ-частицы VSV от стандартных инфекционных частиц. Это позволило охарактеризовать ДИ-частицы биологически и биохимически. Геномная РНК ДИ-частиц VSV меньше геномной РНК стандартного вируса [71], определенные участки вирусного генома, в ней сохранены, тогда как другие утрачены [99]. ДИ-частицы интерферируют с инфекционным вирусом-помощником (хелпером) главным образом путем конкуренции на уровне репликации [70, 125]. Хуанг и Балтимор в 1970 г. [68] впервые обратили внимание на повсеместное распространение ДИ-частиц в ассоциации с большей частью РНК- и ДНК-содержащих вирусов животных. Они предложили называть дефектными интерферирующими те вирусные частицы, у которых нет части геномной РНК или ДНК, но обычные структурные вирусные белки и антигены присутствуют. Для своей репликации частицы нуждаются в гомологичном инфекционном вирусе-помощнике, так как размножаются за его счет в смешанно-зараженных клетках, специфически интерферируя с ним.

Распространение, природа и значение ДИ-частиц вирусов животных широко освещены в обзорах [61, 69, 97, 111, 123, 132, 149]. Большая часть ДИ-частиц эффективно интерферирует с вирусом-помощником, однако есть и такие, которые интерферируют с ним очень слабо. Например, у ДИ-частиц вируса полиомиелита и других пикорнавирусов интерференция слабо выражена и образующееся в процессе репликации число ДИ-частиц невелико по сравнению со стандартным вирусом [28]. Некоторые ДИ-частицы могут в клетках одного типа вызывать сильную, а в клетках другого слабую интерференцию [25, 68, 88, 124]. В боль-

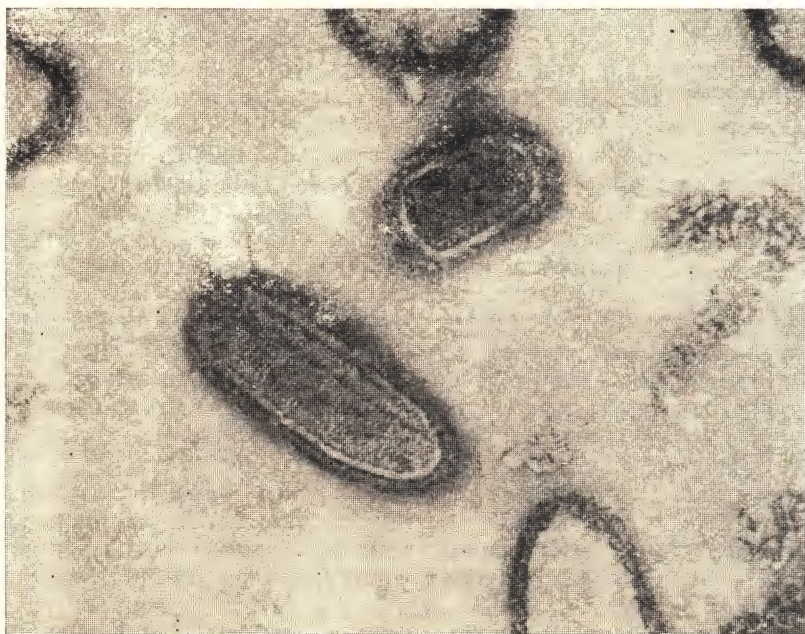


Рис. 6.1. Электронная микрофотография палочкообразного вируса везикулярного стоматита (VSV) и его ДИ-частицы. Более короткая ДИ-частица содержит более короткую РНК, заключенную в более короткие спиральные нуклеокапсиды. $\times 300\,000$.

шинстве случаев накопление дефектных геномов достигается за счет хотя бы незначительного уменьшения накопления инфекционного вируса-помощника. На рис. 6.1 показана микрофотография стандартного вируса VSV и его ДИ-частиц. На микрофотографиях этих и других рабдовирусов видно, что если длина геномной РНК значительно уменьшена (для ДИ-частиц VSV), то длина нуклеокапсида, а следовательно, и размеры вирионных частиц также уменьшены. Однако ДИ-частицы большинства других вирусов могут не отличаться от инфекционного вируса по размерам, внешнему виду, седиментационным свойствам, и в этом случае их намного труднее обнаружить, очистить и изучить. Иногда такие ДИ-частицы отделяют от стандартного вируса на основе разницы плотностей в градиенте хлористого цезия, как, например, ДИ-частицы пикорнавирусов [28]. Однако, как правило, определить присутствие ДИ-частиц и установить их количество можно только по их интерференционному действию, высокому отношению количества физических частиц (или гемагглютинирующей активности) к инфекционности и высокому отноше-

нию количества РНК или ДНК субгеномных размеров (после разрушения вируса) к количеству РНК и ДНК, имеющих размер нормального генома.

Предохранение вирусных препаратов от контаминации ДИ-частицами

Вирусологи должны всегда помнить, что ДИ-частицы могут присутствовать в препаратах вируса и оказывать значительное (часто нежелательное) влияние на биологическую активность вируса. В ранней работе фон Магнуса [152] показано, что «неполный вирус» и интерференция появлялись только после нескольких пассажей неразведенного вируса гриппа в куриных эмбрионах, тогда как серия пассажей того же, но только разведенного вируса (с разведением взвеси вируса перед каждым заражением куриных эмбрионов) приводила к высоким титрам инфекционного вируса в каждом пассаже. Использование серии пассажей неразведенного вируса на культуре клеток (или на куриных эмбрионах, или на животных) до настоящего времени является лучшим методом для накопления ДИ-частиц любого вируса, а использование разведенных инокулятов (низкая множественность заражения) все еще служит самым простым методом, позволяющим избежать избыточного накопления и интерферирующего воздействия нежелательных ДИ-частиц, часто загрязняющих вирусные препараты.

Наилучшей процедурой, позволяющей исключить присутствие ДИ-частиц или значительно уменьшить их содержание в маточной взвеси вируса, является неоднократное последовательное клонирование вируса (непосредственно от бляшки к бляшке) с последующим получением рабочей взвеси с высоким титром, содержащей вирусное потомство только из одной или нескольких бляшек [60, 146]. Но даже в этом случае ДИ-частицы могут присутствовать в рабочей взвеси в небольших (обычно приемлемых) количествах. Если взвесь, содержащую небольшое количество ДИ-частиц, использовать для пассирования без разведения, то при этом всегда (в независимых сериях пассажей) будут накапливаться ДИ-частицы одного и того же типа (типов) [60, 91]. Напротив, при использовании свободной от ДИ-частиц взвеси вируса в каждой серии независимых пассажей будут накапливаться свои ДИ-частицы, различающиеся по свойствам и размерам (рис. 6.2). В первом случае предсуществующие ДИ-частицы накапливаются и быстро начинают преобладать после пассирования без разведения. Во втором случае новые ДИ-частицы случайным образом возникают и накапливаются в каждой серии во время первого неразведенного пассажа [60, 91]. Благодаря этому мы имеем чувствительный тест для выявления очень низкого

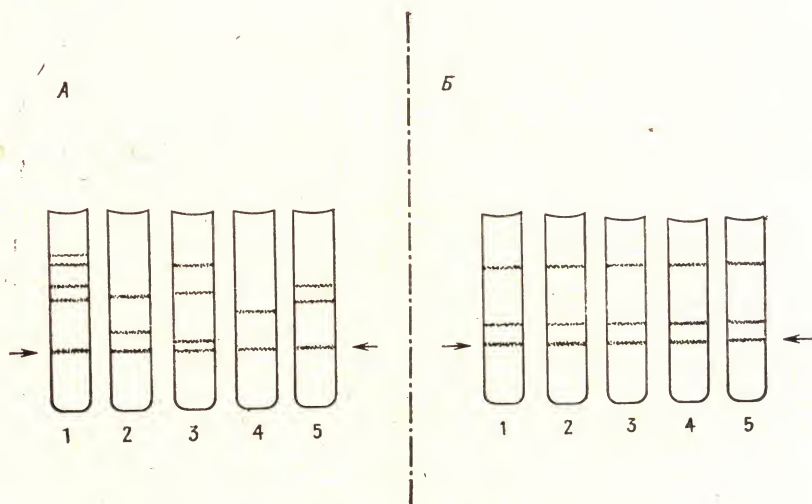


Рис. 6.2. Простой тест для определения присутствия или отсутствия ДИ-частиц в препарате VSV. Анализ в сахарозном градиенте показывает случайное (вероятностное) образование ДИ-частиц различных размеров в препарате вируса, свободном от ДИ-частиц (А) и упорядоченную неслучайную амплификацию ДИ-частиц определенных размеров в препарате вируса, содержащем следовые количества ДИ-частиц (Б). Стрелкой указано положение полосы более крупного инфекционного вируса. Остальные полосы соответствуют различным ДИ-частицам. Вирусные частицы и ДИ-частицы очищали и анализировали после четырех независимых серий неразведенных пассажей из каждого препарата вируса. Приведены результаты только четвертых пассажей, так как до четвертого пассажа полосы ДИ-частиц не были видны. Вирус, использованный для начала каждой серии пассажей в А, взят прямо из бляшки после нескольких последовательных клонирований. Источник вируса, использованного для начала каждой серии пассажей в Б, — клонированный препарат с высоким титром, полученный размножением вируса, взятого из бляшки. Подробности анализа этого типа см. в работе [60].

по сравнению с вирусом количества ДИ-частиц и можем повторно получать ДИ-частицы одного или нескольких типов, а также получать и отбирать новые типы ДИ-частиц.

Пассирование без разведения способствует продукции ДИ-частиц просто потому, что при заражении вирусом с высокой множественностью почти каждая клетка, зараженная ДИ-частицей, содержит также и инфекционный вирус-помощник, который поддерживает репликацию этой частицы. И наоборот, вирус при большом разведении или вирус, полученный прямо из бляшки, с чрезвычайно малой вероятностью попадает в ту же клетку, в которую попала ДИ-частица. После того как разведенный вирус пройдет несколько циклов репликации и охватит большой процент клеток в популяции, вероятность двойного заражения одной

и той же клетки как ДИ-частицей, так и вирусом-помощником возрастает; однако к этому времени во многих клетках происходит репликация стандартного вируса, и соотношение вируса и ДИ-частиц в конечном урожае будет высоким.

В связи с тем что в различных системах вирус — клетка скорость накопления ДИ-частиц значительно варьирует, степень загрязнения вирусных препаратов ДИ-частицами также сильно варьирует. Например, для получения детектируемого количества ДИ-частиц пикорнавирусов требуются десятки последовательных неразведенных пассажей [28, 108], в то время как клонированный вирус бешенства, полученный из бляшки, продуцирует большое количество ДИ-частиц во время первого неразведенного пассажа на клетках ВНК₂₁ [60]. VSV при размножении на этих клетках образует большое количество ДИ-частиц в течение нескольких пассажей неразведенной взвеси клонированного вируса, а на клетках HeLa ДИ-частицы не обнаруживаются даже после 27 пассажей [60]. Каждая система вирус — клетка должна быть исследована отдельно, но в целом тенденция наиболее эффективного образования и накопления ДИ-частиц наблюдается для клеток, наиболее чувствительных к вирусу, дающих максимальные титры вируса.

Определение количества ДИ-частиц

Для определения количества ДИ-частиц используют ряд методов. Сюда входят очистка и прямое наблюдение полос ДИ- (и вирусных) частиц в сахарозном градиенте [72]; определение снижения урожая вируса в опытах на клеточном монослое [14]; подавление формирования инфекционных центров [155], вирус-специфического синтеза РНК [10], а также вызываемого вирусом разрушения клеток [107]; амплификационный анализ, основанный на измерении количества ДИ-частиц, накапливающихся при последовательных пассажах с вирусом-помощником; определение количества фокусов выживающих клеток, основанное на том, что ДИ-частицы защищают клетки, зараженные стандартным вирусом [82, 130, 156]. Определение фокусов выживающих клеток (негативных бляшек) для ДИ-частиц служит наиболее чувствительным тестом, так как каждая отдельная ДИ-частица защищает от разрушения островки клеток (при малой дозе введенного инфекционного вируса) (рис. 6.3). Метод был применен для вируса лимфоцитарного хориоменингита [72], VSV [33] и вируса бешенства [54]. Однако этот метод годится далеко не для всех систем вирус — клетка, так как ДИ-частицы должны при этом подавлять вызываемое вирусом разрушение клеток, а также быстро накапливаться и распространяться на соседние клетки, чтобы дать возможность формироваться колониям выживающих клеток.

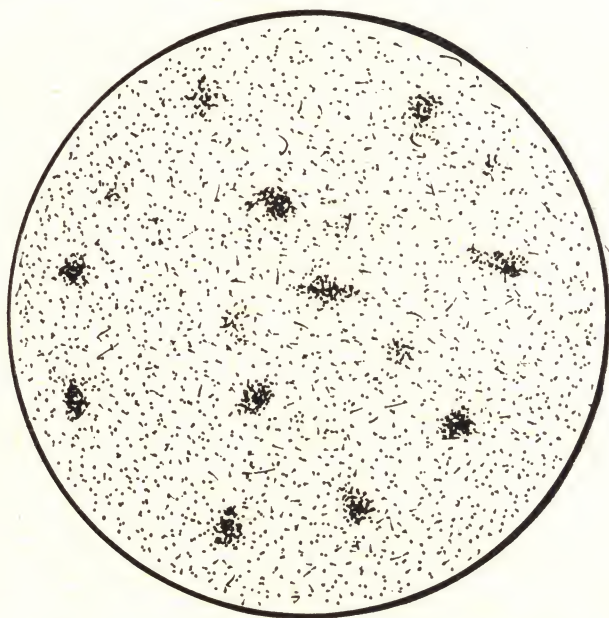


Рис. 6.3. Схема количественного определения ДИ-частиц по образованию фокусов. Это наиболее чувствительное биологическое определение ДИ-частиц впервые разработано для вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCV) [129]. Монослой высокочувствительных клеток заражали вирусом-помощником при низкой множественности и обрабатывали различными разведениями культуральных жидкостей или гомогенатов ткани, содержащих ДИ-частицы. Если единичная ДИ-частица поражает клетку, то эта клетка и клетки, окружающие ее, защищены от разрушения вирусом, так как ДИ-частица амплифицируется и распространяется в окружающие клетки, образуя неровные клеточные колонии на фоне мертвых или умирающих клеток. Такие определения «негативных» бляшек лучше проводить с медленно растущими умеренными вирусами; они очень трудно воспроизводятся с быстро реплицирующимися более вирулентными вирусами или со слабо интерферирующими ДИ-частицами. Эти тесты (если только они возможны) чрезвычайно чувствительны, хотя некоторые фокусы так малы и так неровны, что их нельзя четко отличить от групп умирающих клеток в монослое.

Интегрированные дефектные вирусные геномы

Выяснение Львовым природы индукции и лизогении бактериофагов в начале 50-х гг. [106] не только вызвало революцию в генетике и биологии в целом, но и привело к признанию того, что вирусы играют важную роль в эволюции их хозяев. Лизогенные вирусы могут переносить гены клетки-хозяина путем *ограниченной трансдукции* (переноса ограниченного числа генов, прилегающих к специфическим участкам интеграции) или *генерализованной трансдукции* (переноса генов из любой области

хромосомы). Они могут инактивировать гены клетки-хозяина или способствовать их экспрессии, придавать новые (кодированные вирусными генами) генетические свойства путем *конверсии*, вводить, устранять и (или) перемещать регуляторные элементы, такие как вставочные последовательности (IS-элементы, от англ. insertion sequences) и транспозоны, а также способствовать рекомбинационным изменениям ДНК клетки-хозяина.

Наибольшие усилия и внимание исследователей сосредоточены на недефектных лизогенных фагах, особенно на фаге λ . Вместе с тем существуют весоные доказательства, что в бактериальных клетках широко распространены интегрированные дефектные геномы фагов и что они могут эволюционировать совместно с клетками и при этом влиять на эволюцию последних (а также на эволюцию недефектных вирусов, плазмид, транспозонов и т. д., которые проникают в эти клетки). Дефектные фаги можно легко индуцировать и наблюдать в различных штаммах бактерий. Индукцию осуществляют митомицином С, УФ-светом или другими агентами, способными индуцировать литическую репликацию умеренных фагов лизогенных бактерий. При этом часто индуцируется образование неинфекционных частиц, неотличимых от бактериофагов или отдельных частей фагов, таких как пустые головки, полные головки, хвосты, оболочки и т. д. Эти индуцированные частицы фагов или их фрагменты нередко проявляют бактерицидную активность, вызывая гибель некоторых чувствительных штаммов бактерий [21, 104]. Экспериментами по *спасению маркера* можно показать, что многие маскированные дефектные фаги, интегрированные с геномом бактериальной клетки, содержат функционирующие фаговые гены, так как последние способны рекомбинировать с геномом суперинфицирующих родственных фагов и нормально функционировать в образующемся рекомбинантном фаговом потомстве. Кроме того, существует бесчисленное количество дефектных фаговых геномов, интегрированных с бактериальными хромосомами, плазмидами и т. д., которые не удается определить с помощью спасения маркера, индукции, иммунитета к суперинфекции или другими простыми способами. Тем не менее эти «молчащие» дефектные гены фагов могут при определенных условиях в значительной степени влиять на выживаемость и эволюцию их клеток-хозяев.

В последние годы было обнаружено, что глубокое генетическое и биологическое влияние на своих хозяев могут оказывать также дефектные вирусы животных и человека. Как уже обсуждалось в гл. 5, значительная часть онкогенных РНК-содержащих опухолеродных вирусов — это дефектные вирусы, зависящие от вирусов-помощников и несущие клеточные *onc*-гены, рекомбинированные с фрагментами вирусных генов [15]. В других случаях длинные концевые повторы (LTR-последовательности) де-

фектных ретровирусов могут действовать как IS-элементы и активировать клеточные *onc*-гены при встраивании неподалеку от них [113, 121]. Введение ДНК из опухолей человека в чувствительные к трансформации клетки в культуре ткани позволило идентифицировать ряд *onc*-генов, которые могут быть связаны с развитием опухолей человека, причем данная связь имеет тканеспецифический характер. Эти гены оказались такими же *onc*-генами или семействами генов, как те, которые были «захвачены» РНК-содержащими опухолеродными вирусами [153]. По-видимому, многие дефектные провирусы приобретают различные *onc*-гены и во время заражения переносят их в клетки хозяина. Эти *onc*-гены обычно функционируют под контролем клеточных регулирующих программ, но могут вызвать злокачественное перерождение в случае, если изменятся или попадут под действие новой регуляции в составе генома дефектного вируса (или в перестроенной хромосоме невирусных опухолей). Эти взаимодействия генов дефектных вирусов и клеток обнаружены благодаря интересу к канцерогенезу, а также возможности выявлять такие взаимодействия по клеточной трансформации. Есть основания полагать, что дефектные гены должны аналогичным образом широко взаимодействовать с бесчисленным количеством других генов млекопитающих и что они в сущности являются частью нашего генетического фонда.

Вирусы-сателлиты

Вирусы-сателлиты представляют собой крайнюю форму паразитизма. Они относятся к вирусам, паразитирующим на генных продуктах, образованных другими, часто неродственными им вирусами [6]. Подобно ДИ-частицам, они дефектны и обычно до некоторой степени интерферируют со своими вирусами-помощниками; однако в отличие от ДИ-частиц возникновение вирусосателлитов не связано (по крайней мере непосредственно) с делецией генов у вирусов, от которых они зависят в своей репликации. Очень часто РНК- или ДНК-геном вируса-помощника не имеет гомологии с геномом вируса-сателлита. Один из простейших примеров — сателлит вируса некроза табака (STNV) [131]. Он полностью зависит в своей репликации от одновременного заражения клеток табака его инфекционным вирусом-помощником, вирусом некроза табака. Икосаэдрические частицы STNV значительно меньше, чем частицы вируса некроза табака, а их дефектный РНК-содержащий геном меньше генома вируса некроза табака. Одноцепочечный РНК-геном STNV кодирует белок своей оболочки и после репликации за счет своего вируса-помощника покрывается этой оболочкой [131].

Значительно более сложным сателлитным вирусом является

колифаг р4. Этот умеренный фаг сам заражает и лизогенизирует *Escherichia coli*, но реплицироваться и образовывать зрелые фаговые частицы без своего недефектного вируса-помощника колифага р2 (более крупного и тоже умеренного фага) он не может. Ряд продуктов генов фага р4 активирует позднюю транскрипцию генов его помощника р2. Некоторые из продуктов поздних генов р2 представляют собой капсидные белки, а другие активируют синтез капсидных белков поздними генами сателлитного вируса р4, который инициирует синтез р2. Такое взаимное взаимодействие генных продуктов вируса-помощника и вируса-сателлита называется транс-активацией [11].

Интересным примером сателлитных вирусов человека служат аденоассоциированные вирусы (AAV) [135, 145]. Эти небольшие икосаэдрические вирусы содержат одну плюс- или минус-цепь ДНК, которая кодирует три капсидных белка для инкапсидации их небольших дефектных геномов. AAV могут реплицироваться только в ядрах клеток, которые одновременно заражены аденовирусами (герпесвирусы тоже могут частично поддерживать репликацию AAV). Репликация AAV интерферирует с репликацией их помощников-аденовирусов и с трансформацией клеток аденовирусами. От людей, зараженных аденовирусами, выделено несколько серологических типов AAV, но их роль, если вообще они играют какую-то роль, в ослаблении (или усилении) аденовирусного заболевания неизвестна.

Примечательным, но плохо изученным дефектным сателлитным геномом является так называемый дельта-агент, ассоциированный с некоторыми тяжелыми формами болезни печени, вызываемыми вирусом гепатита В. Хотя вирус гепатита В содержит ДНК, геном его сателлита — небольшая РНК с мол. массой $\sim 5,5 \cdot 10^5$ [18], по размеру близкая к геному STNV. В настоящее время слишком мало известно о природе этой РНК, для того чтобы можно было объяснить эту ситуацию. Возможно, она связана с тем фактом, что вирус гепатита В использует для синтеза вирусной одноцепочечной ДНК обратную транскрипцию РНК. РНК дельта-агента была обнаружена в сыворотке человека в субпопуляции частиц поверхностного антигена гепатита В диаметром 35—37 нм, несущих дельта-антиген [18]. Дельта-агент можно передать шимпанзе, но только вместе с помощником — вирусом гепатита В. Для выяснения его роли в развитии тяжелой болезни печени или каких-либо других заболеваний требуются дополнительные исследования.

Существует много вирусов-сателлитов и сателлитоподобных вирусов, в особенности среди вирусов растений с разделенными геномами. По крайней мере некоторые из них, такие как CARN 5 (РНК, ассоциированная с вирусом мозаики огурцов) [128], могут играть важную роль в природе, потому что они су-

шественно влияют на течение заболевания, значительно ослабляя или утяжеляя проявления болезни в зависимости от растения-хозяина [128]. Без достаточной информации о последовательностях нуклеиновых кислот часто бывает невозможно отличить вирусы-сателлиты от ДИ-частиц. Например, вирус, сопутствующий хроническому параличу (пчел) (CPVA), является сателлитоподобным вирусом, который реплицируется только в пчелах, зараженных вирусом хронического паралича (пчел) (CPV), и серологически не связан с CPV. Однако последовательность его РНК имеет некоторую гомологию с последовательностью РНК CPV, и, возможно, он эволюционировал из одного из сегментов этой РНК [119]. Можно поэтому рассматривать его либо как вирус-сателлит, либо как значительно эволюционировавшую ДИ-частицу. Вместе с тем сателлит вируса извилистости турнепса, утяжеляющий проявления болезни у растения [5], имеет лишь небольшой процент гомологии олигонуклеотидов со своим вирусом-помощником. По-видимому, он эволюционировал либо из сегмента генома вируса-помощника, либо из сегмента какой-нибудь другой неродственной РНК.

Псевдовироны

Псевдовироны представляют собой частицы, содержащие нуклеиновую кислоту клетки-хозяина, полностью заместившую нуклеиновую кислоту вирусного генома. Их биологическая роль в инфекциях, вызываемых вирусами животных, непонятна, но для ряда вирусов животных, таких как вирус полиомы, псевдовироны составляют значительную часть урожая в клетках некоторых типов. Фаги, осуществляющие генерализованную трансдукцию, обычно содержат только последовательности ДНК клетки-хозяина, и эти фаговые «псевдовироны» имеют у прокариот огромное генетическое значение. Независимо от того имеют ли генетическое значение в природе псевдовироны вирусов животных, их исследуют в свете потенциального механизма эффективного введения в клетки животных избранных чужеродных генов.

Условно-дефектные геномы

Условно-дефектные вирусы — очень важный класс дефектных вирусов, описание которых выходит за рамки этой главы. Они представляют собой мутантные геномы, дефектные только в определенных условиях. К наиболее важным среди них относятся температурочувствительные мутанты и мутанты по спектру хозяев. Некоторые из них способны интерферировать с вирусами дикого типа, а также имитировать биологическое поведение ДИ-частиц и в других отношениях. Условные мутанты обсуждаются в гл. 9.

Структуры ДИ-геномов: механизм образования и интерференция

Все ДИ-частицы интерферируют, реплицируясь и инкапсидируясь за счет своих вирусов-помощников. Ниже обсуждаются структуры их геномов, а также вероятный способ их образования и вызываемой ими интерференции.

РНК-содержащие вирусы

VSV как модельная система РНК-геномов ДИ-частиц

О субгеномном делеционном мутанте РНК- или ДНК-содержащего вируса можно сказать, что он обладает свойствами ДИ-частицы, если в нем сохраняются или адекватно заменяются по крайней мере два участка последовательности родительского вирусного генома. Это участки, ответственные за специфическую инициацию репликации, осуществляемой вирусной репликазой, а также специфическое распознавание и инкапсидацию вирусной геномной нуклеиновой кислоты. Участки, распознаваемые репликазой, необходимы для того, чтобы ДИ-геномы могли реплицироваться с помощью репликазы родительских вирусов, а участки инициации специфической инкапсидации необходимы для упаковки реплицированных или реплицирующихся ДИ-геномов в ДИ-частицы или ДИ-нуклеокапсиды. Может иметь значение и размер ДИ-генома, так как ДИ-РНК или ДИ-ДНК должны сформировать стабильный ДИ-вирион. Обычно в случае икосаэдрических вирусов ограничения размеров наиболее строгие, так как часто они формируют стабильные вирионы только в том случае, если нуклеиновая кислота целиком заполняет капсид. Вероятно, поэтому большая часть ДИ-частиц пикорнавирусов содержит геномы с относительно небольшими делециями [28, 108]. В случае частиц альфавирусов требования к размерам РНК выполняются благодаря упаковке в каждый ДИ-вирион нескольких небольших ДИ-геномов [86].

Точный молекулярный механизм образования ДИ-частиц и интерференции, вызываемой ДИ-частицами, еще не раскрыт ни для одного вируса, однако изучение ДИ-геномов уже привело к созданию ряда полезных моделей и гипотез.

Наиболее широко изучена структура ДИ-частиц вирусов с негативным геномом, и сейчас ясно, что вирусы, входящие в эту группу: VSV, гриппа, Сендай и др. могут формировать ДИ-частицы разных структурных классов. Детальному описанию структуры ДИ-РНК посвящен ряд обзоров [97, 123].

На рис. 6.4 схематически представлены четыре известных структурных типа геномной РНК ДИ-частиц VSV и показано их

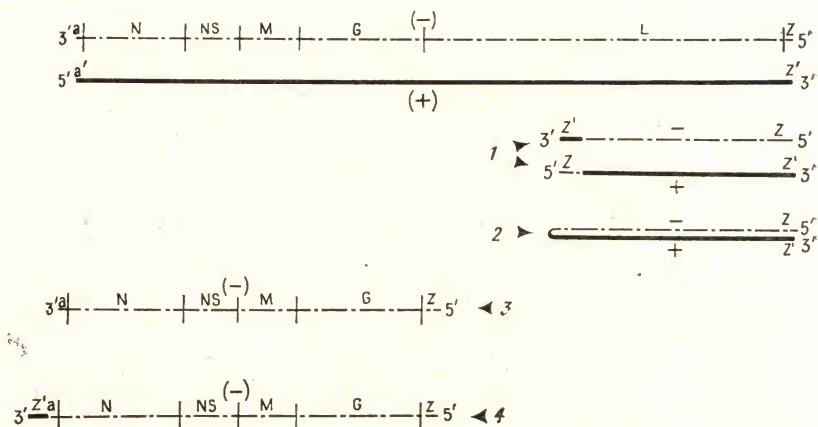


Рис. 6.4. Схематическая диаграмма четырех известных главных типов структур РНК-генома ДИ-частиц VSV. Негативный РНК-геном инфекционного вируса (вверху) служит матрицей для синтеза полноразмерной плюс-цепи РНК (сплошная линия), и наоборот. Обратите внимание, что 3'-конец (Z') плюс-цепи является участком инициации только для репликазы, в то время как 3'-конец (а) минус-цепи вируса служит участком инициации как для транскрипции, так и для репликации. В ДИ-частицах VSV наиболее обычного типа (тип 1, ствол или «ручка сковороды») последовательность гомологична части 5'-половины вирусной РНК (части цистрона белка L); в ней всегда сохраняется 5'-конец, а ствол (комплементарная копия 5'-конца) перемещен к 3'-концу. Поэтому как минус-, так и плюс-цепи ДИ-частиц этого типа сохраняют участок инициации репликации (Z'), но теряют участок инициации транскрипции (а). ДИ-частица типа 2 (тип застежки, или шпильки) похожа на ДИ-частицу типа 1 (стволовой тип) по структуре генома, но отличается тем, что в ней плюс- и минус-цепи ковалентно связаны. ДИ-частица типа 3 (тип с внутренними делециями) сохраняет оба конца родительского вирусного генома, но утрачивает внутренние нуклеотидные последовательности (в данном случае большую часть цистрона белка L). ДИ-частица типа 4 (мозаичный или сложный тип) имеет множественные перестройки (в данном случае множественные делеции внутренней части цистрона L плюс добавление Z'-ствола к 3'-концу). Из-за наличия этого ствола инактивируется 3'-участок инициации транскрипции (а). ДИ-частицы с внутренней делецией и мозаичного типа редко встречаются у VSV, но обычны для некоторых других РНК-содержащих вирусов. Структуры ДИ-геномов VSV рассмотрены в обзорах [97, 123], а данные об их нуклеотидных последовательностях и других биологических свойствах обсуждаются в ряде работ [37, 43, 83—85, 109, 126, 133, 136, 139, 140, 141, 157].

отношение к структуре генома родительского вируса. Следует отметить, что минус-цепь РНК этого вируса кодирует 5 вирусных мРНК, а также лидерную РНК, комплементарную 3'-концевому участку геномной РНК. 3'-Конец негативного генома участвует в инициации транскрипции и репликации. В противоположность этому 3'-конец плюс-цепи РНК (комплементарной по отношению к вирионной минус-цепи) участвует только в репликации новых минус-цепей.

ДИ-частицы с коротким стволом (тип 1)

Наиболее распространены ДИ-частицы с коротким стволом или частицы типа «ручки сковороды». Эти ДИ-частицы почти полностью утратили все вирусные гены, кроме 5'-концевого участка, кодирующего только часть белка L (полимеразы). Это означает, что не может быть синтезирован ни один полноразмерный функционально активный продукт и, кроме того, невозможна транскрипция, поскольку отсутствует участок инициации на 3'-конце. Однако эти «молчащие» при транскрипции ДИ-частицы активно участвуют в репликации в связи с тем, что в результате образовавшего их рекомбинационного события «стволовая» последовательность Z' (последовательность, комплементарная 5'-концу вирионной РНК) передвигается на 3'-конец минус-цепи РНК ДИ-частицы. При этом на 3'-концах *обеих* (плюс и минус) цепей РНК присутствует участок, инициирующий репликацию (Z'). Однако стволы Z'-последовательности, перенесенные на 3'-конец минус-цепи ДИ-геномов, варьируют по длине и могут иметь от 45 до 70 нуклеотидов. Таким образом, последовательность стволочной части на 3'-конце минус-цепи ДИ-частиц отличается от Z'-последовательности на конце плюс-цепи вирусной РНК или плюс-цепи ДИ-РНК.

Этот перенос и изменение стволочного Z'-участка на 3'-конце ДИ-генома, вероятно, создают высокоаффинный для репликазы участок инициации, так как такой стволочной тип ДИ-частиц (класса 1) наиболее распространен, наиболее конкурентоспособен и наиболее эффективно интерферирует. Есть доказательства, свидетельствующие о том, что стволочные участки важны для репликации ДИ-частиц и вызываемой ими интерференции [123]. Айзекс и Кин [73] нашли, что с 3'-концевыми участками генома инфекционного вируса и ДИ-частиц стволочного типа контактируют разные последовательности компонента РНК-полимеразы вируса VSV — белка NS. Это позволяет предположить, что ДИ-частицы стволочного типа могут иметь более высокую аффинность и поэтому быть более эффективными конкурентами во время репликации. Значительное преимущество в репликации этих ДИ-частиц над вирусом-помощником, по всей вероятности, связано с: а) наличием Z'-стволов на 3'-конце плюс- и минус-цепей РНК ДИ-частиц; б) отсутствием на 3'-конце участков инициации транскрипции, благодаря чему геномы ДИ-частиц не вовлекаются в транскрипцию, а служат исключительно для репликации; в) большей эффективностью репликации, обусловленной перенесенным на 3'-конец минус-цепи Z'-стволом и новой последовательностью в месте его присоединения. Меньшая длина РНК-генома ДИ-частиц способствует более раннему завершению каждого цикла его репликации, однако относительные размеры

геномной ДИ-РНК VSV — отнюдь не главный фактор, определяющий эффективность их репликации и интерференции [60, 123].

ДИ-частицы типа застёжки

Примером второго типа ДИ-частиц VSV, показанных на рис. 6.4, являются частицы типа «застёжки» или «шпильки». ДНК-геномы этого довольно распространенного типа содержат вирусные негативные 5'-концевые участки различной длины, которые на «сгибе» шпильки ковалентно связаны со своей точной комплементарной копией [98, 122]. ДИ-частицы 2-го типа можно рассматривать как варианты ДИ-частиц 1-го ствольного типа, со стволом-дуплексом, простирающимся на всю длину РНК. Поскольку ствол содержит 3'-концевой участок типа Z' , механизм интерференции представляется аналогичным обсуждавшемуся выше для ДИ-частиц 1-го типа. Следует, однако, отметить, что разница между плюс- и минус-цепями у этих ДИ-частиц утрачена, так как каждый акт репликации ведет к появлению молекулы потомства, идентичной молекуле родительской матрицы (каждая молекула РНК на 50% состоит из плюс-цепи и на 50% — из минус-цепи).

ДИ-частицы с внутренней делецией

Третий тип ДИ-частиц VSV совершенно отличен от предыдущих по структуре геномной РНК в связи с тем, что в них оба конца геномной РНК родительского вируса сохранены, а внутренняя часть генома deletирована. Этот тип ДИ-частиц может быть транскрипционно активным, потому что он сохраняет 3'-концевой участок инициации транскрипции и репликации (а). Как показано на рис. 6.4, одна из этих ДИ-частиц с внутренней делецией сохраняет четыре из пяти генов и утратила значительную часть гена большого белка L (полимеразы) [37, 43, 126, 132, 157]. Данный тип ДИ-частиц очень редок, возможно потому, что такие частицы не могут эффективно конкурировать с ДИ-частицами ствольного типа [43, 126]. Образуются ли они с большой частотой, а затем быстро вытесняются другими ДИ-частицами, неизвестно, но они так мало конкурентоспособны, что их очень трудно сохранить и экспериментально исследовать. Однако эти ДИ-частицы транскрибирующего типа интерферируют со стандартным вирусом. Механизм этой интерференции, вероятно, отличается от обсуждавшегося ранее механизма интерференции ДИ-частиц ствольного типа, так как для этих частиц характерен малый размер мишени при ультрафиолетовой инактивации способности к интерференции и, кроме того, они интерферируют с

инфекционным вирусом в процессе первичной транскрипции [12, 13]. Возможно, эти и другие транскрибирующие ДИ-частицы могут осуществлять интерференцию посредством синтеза aberrантных РНК-транскриптов и (или) aberrантных белков, блокирующих синтез вируса. Интересно, что транскрибирующие ДИ-частицы VSV штамма Индиана могут проявлять гетеротипическую интерференцию в отношении серологически неродственного штамма VSV Нью-Джерси [13]. Это еще одно доказательство того, что механизмы их интерференции отличны от механизмов, используемых ДИ-частицами ствольного типа.

ДИ-частицы мозаичного типа

Четвертый тип ДИ-частиц — не единичная определенная структура; в него входят все ДИ-частицы, имеющие сложное мозаичное перераспределение сегментов вирусного генома, т. е. такие, для образования генома которых необходимо по крайней мере несколько рекомбинационных событий. Геном ДИ-частицы мозаичного типа, представленный на рис. 6.4, очень интересен, так как он почти идентичен геному транскрибирующей ДИ-частицы с внутренней делецией, также показанному на рис. 6.4, но отличается от него наличием Z' -ствола длиной в 70 нуклеотидов, добавленного к $3'$ -концу простой ДИ-частицы с внутренней делецией. Частицы обоих типов образовались в одной и той же вирусной популяции, следовательно, они могли возникнуть последовательно или из общего предшественника [43, 126]. 70-Нуклеотидный ствол, присоединенный к $3'$ -концу транскрибирующих ДИ-частиц, обуславливает два значительных биологических эффекта: полное подавление транскрипционной активности, так как удаляется с $3'$ -конца и переносится во внутреннюю позицию участок инициации транскрипции, а также придание частице настолько сильной интерферирующей и конкурентной способности, что она опережает в накоплении копий родственные ей транскрибирующие ДИ-частицы, в которых на $3'$ -конце нет Z' -ствола [43, 126]. Это подчеркивает репликативные преимущества, приобретаемые ДИ-частицами VSV благодаря $3'$ -концевым стволам, и репликативное несовершенство $3'$ -концов, которые большую часть времени осуществляют транскрипционную деятельность.

Возможно возникновение множества различных видов вирусной РНК мозаичного типа. Происходящие при этом перераспределения ведут к появлению довольно сложных и причудливых ДИ-РНК-геномов, что обсуждается ниже на примере ДИ-частиц вирусов гриппа и леса Семлики. Не исключено даже, что обнаружатся ДИ-частицы, содержащие участки РНК нескольких различных вирусов и (или) участки РНК клетки-хозяина, разбросанные между участками вирусной РНК [110a, 117a].

Возможные механизмы образования ДИ-геномов

В связи с тем что в настоящее время нет хорошей бесклеточной системы для изучения образования ДИ-частиц (и вообще рекомбинаций РНК), умозрительные теории о возможных механизмах перераспределения РНК генома можно создавать только на основе изученных структур. Наиболее правдоподобная и широко принятая общая модель образования ДИ-частиц называется моделью «обратного копирования» [67, 102]. Согласно этой модели, репликаза сходит с матрицы и несет новую цепь с собой, чтобы возобновить синтез и продолжить элонгацию цепи РНК на новой матрице (или на новом участке старой матрицы). Возникновение по этому механизму наиболее распространенного типа ДИ-частиц (с коротким стволом, 1-го типа) схематически представлено на рис. 6.5.

В этом случае во время синтеза новой минус-цепи РНК на плюс-рибонуклеопroteinовой матрице репликаза начинает синтез на участке инициации на 3'-конце (участок Z' на рис. 6.4). Часть пути она проходит через цистрон большого белка L, затем покидает плюс-матрицу (неся с собой 3'-конец короткой новосинтезированной цепи) и возобновляет синтез, используя в качестве матрицы участок новосинтезированной цепи, расположенный близко от ее 5'-конца. Потом она проходит короткое расстояние к 5'-концу, синтезируя последовательность, входящую в состав короткого ствола (Z' на рис. 6.4), и завершая этим формирование новой геномной РНК ДИ-частицы типа «ручки сковороды», или короткого (1-го типа) ствола. В обзорах Перро [123] и Лазарини и др. [97] эта модель расширена, для того чтобы объяснить, как благодаря «прыгающим репликасным комплексам» или аномальной репликации типа «обратного копирования» могут появляться ДИ-частицы любого известного типа. Например, «шпилькообразные» геномы 2-го типа могут возникать в основном так же, как и ДИ-геномы стволового типа, за исключением того, что участок возобновления синтеза для репликазы будет расположен на 3'-конце новосинтезированной цепи или вблизи от него, а не на близком к 5'-концу участке. Не исключено, что репликаза «предпочитает» некоторые нуклеотидные последовательности в качестве участков возобновления синтеза. Шуберт и др. [136] предполагают, что предпочтительным местом возобновления синтеза может быть последовательность GGUCUU в позиции 43—48 у 5'-конца вирусной РНК, так как та же последовательность присутствует в положении 4—9 на 3'-конце геномной РНК вируса. В связи с тем что 3'-конец вирусной РНК служит участком инициации для репликазы-транскриптазы, последовательность этого гексамера может быть частью последовательности для распознавания промотора.

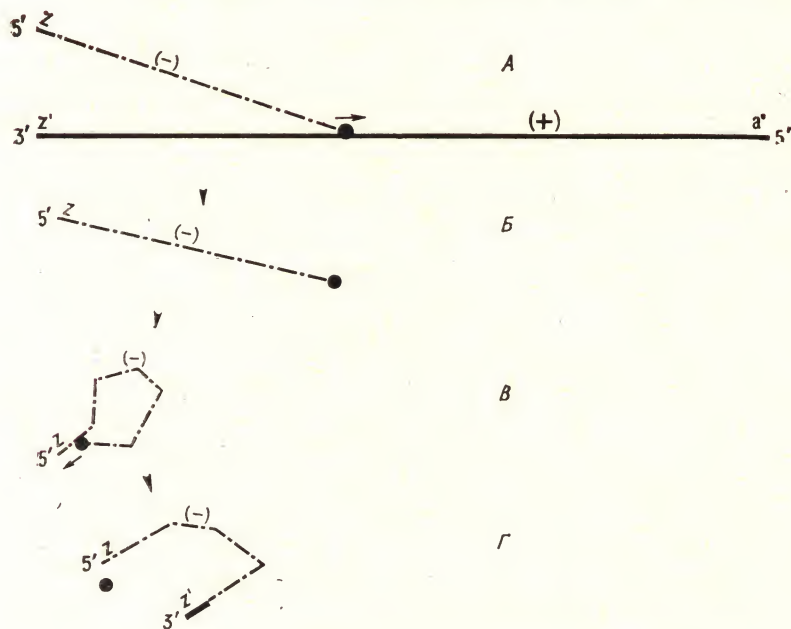


Рис. 6.5. Модель образования РНК-содержащих ДИ-геномов с концевыми стволами, или «ручками сковороды» (тип 1 ДИ-генома на рис. 6.4), возникающих в результате репликативных ошибок типа обратного копирования. Эта модель предложена авторами в 1977 г. [67, 102]. Обратите внимание, что когда 5'-конец вирусной минус-цепи копируется с 3'-конца плюс-цепи матрицы (А), комплекс репликазы (черный кружок) и синтезируемой РНК сходит с матрицы (В). Затем синтез возобновляется возле 5'-конца новосинтезированной минус-цепи (штриховая линия с точками) и завершается на 5'-конце этой новой матрицы (В). В результате (Г) синтезируется ДИ-геном частицы с Z'-стволом (широкая сплошная линия) на 3'-конце. Таким образом, концы ДИ-частиц этого типа представляют собой автокомплементарные стволы, или «ручки сковороды».

На рис. 6.6 показано, как репликационный комплекс «прыгает», или «перескакивает», от одной части плюс-цепи РНК-матрицы к более отдаленному участку на той же матрице и как это приводит к утрате внутренних последовательностей при сохранении обоих концов РНК родительского вирусного генома. В результате появляются различные ДИ-частицы с внутренними делециями (частицы 3-го типа на рис. 6.4). Сходные схемы можно применить для объяснения механизма образования любого другого известного типа ДИ-геномных структур ошибками репликации [97, 123]. Будучи очень правдоподобными, эти схемы все же остаются гипотетическими, и поэтому не исключено, что некоторые ДИ-частицы образуются с помощью иных механизмов, отличных от репликативных ошибок (или с помощью механизмов, дейст-

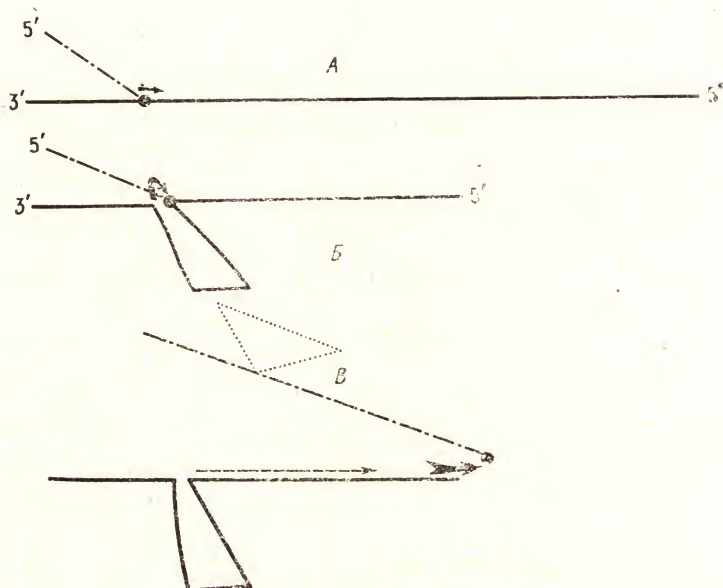


Рис. 6.6. Модель репликативных ошибок, объясняющая образование ДИ-геномов с внутренними делециями. А. Нормально реплицирующийся вирус с новосинтезируемым 5'-концом, растущим по мере того как репликаза (черный кружок) копирует вирусную геномную матрицу, начиная с участка инициации на 3'-конце. Б. Репликационный комплекс «прыгает» (перескакивает, или проскальзывает) через внутренние участки РНК-матрицы, а затем возобновляет синтез на более удаленном по направлению к 5'-концу матрицы участке. В. Вновь образовавшийся геном ДИ-частицы сохраняет оба конца, но утрачивает внутренний участок (треугольник) вирусного генома. Подобные модели репликативных ошибок или прыжков репликазы, объясняющие образование различных ДИ-геномных структур, разработаны Перро [123] и Лазарини [97].

вующих совместно с ними). Важно подчеркнуть, что могут существовать ДИ-частицы (в том числе даже возникающие с высокой частотой), которые редко или даже никогда не определяются, так как они неконкурентоспособны. Для того чтобы быть конкурентоспособными, вновь образованные ДИ-частицы должны иметь эффективные участки инициации репликации на 3'-конце обеих (плюс- и минус-) цепей РНК. Кроме того, в связи с тем, что РНК-содержащие вирусы с негативным геномом в процессе репликации используют в качестве матрицы спиральные рибонуклеопротеиновые частицы (нуклеокапсиды), а не голую РНК, геномы ДИ-частиц, для того чтобы быть конкурентоспособными, должны сохранять функционально активные участки для образования нуклеокапсидов.

Роль 5'-концевых последовательностей в инкапсидации ДИ-частиц

Как упоминалось ранее, все РНК вирусов с негативным геномом и ДИ-частиц должны сохранять РНК-последовательности, инициирующие их инкапсидацию (белком N), для того чтобы могли сформироваться спиральные нуклеокапсиды, так как при репликации (и транскрипции) в качестве матрицы используется не свободная РНК, а входящая в состав нуклеокапсида. Созревание инфекционного вируса или зрелых ДИ-частиц требует, кроме того, отпочковывания нуклеокапсидов на клеточной мембране и приобретения вирусных оболочек, состоящих главным образом из липидов клеточной мембраны и вирусных белков. Таким образом, последовательность, инициирующая сборку нуклеокапсидов, необходима как для их внутриклеточного формирования и репликации, так и для дальнейшей сборки зрелого вируса и ДИ-частиц.

Система сборки спирального нуклеокапсида лучше всего изучена на примере сборки вируса табачной мозаики (TMV). Она может происходить в буферном растворе *in vitro* [47], причем для инициации сборки необходимо, чтобы в РНК присутствовала особая последовательность инициации (\sim за 1000 нуклеотидов от 3'-конца), имеющая соответствующую вторичную структуру [160]. Для инициации сборки TMV мономеры белка должны агрегировать в диски. Затем происходит элонгация в направлении 3' \rightarrow 5' путем быстрой сборки мономерных субъединиц на РНК, пока вся РНК от участка нуклеации до 5'-конца не будет заключена в спиральный тяж. Завершение сборки происходит в направлении 5' \rightarrow 3' путем медленного добавления агрегатов белковых дисков, ведущего к инкапсидации последних примерно 1000 нуклеотидов от участка инициации сборки до 3'-конца [50].

Данные, касающиеся сборки *in vitro* спирального нуклеокапсида какого-либо из вирусов животных, отсутствуют, так как пока не разработана система сборки в буферном солевом растворе. Однако получена сборка нуклеокапсида VSV в сложной системе *in vitro*, где новосинтезированный на рибосомах *in vitro* белок N собирается вокруг новосинтезируемой вирусной РНК в ходе ее репликации на нуклеокапсидной матрице [36, 57, 58]. В связи с тем что участки инициации репликации находятся на 3'-конце плюс- и минус-цепей РНК VSV, 5'-конец синтезируемой цепи РНК потомства оказывается первым участком, доступным для сборки во время синтеза. Поэтому инициация сборки (нуклеация) скорее всего происходит на синтезируемом 5'-конце или поблизости от него, так как новосинтезируемая РНК оказывается частью образующегося нуклеокапсида, который наращивается в процессе репликации [142]. Действительно, Бламберг и Кола-

ковский идентифицировали участки нуклеации сборки нуклеокапсида как часть обогащенных адениловыми остатками последовательностей в 5'-концевой части РНК VSV [16, 17]. Это следует из того, что короткие 5'-последовательности (называемые лидерными РНК), транскрибируемые с 3'-концевых участков плюс- и минус-цепей нуклеокапсидов, могут собираться в очень мелкие нуклеокапсидные диски, седиментирующие при 18S [30, 140, 141]. Эти кольцевые рибонуклеопротеины содержат лидерные последовательности в резистентной к рибонуклеазе форме в оболочке из белка N. Ясно поэтому, что участки инициации сборки комплекса белок N — РНК так же, как участки инициации репликации, входят в состав 5'-концевых последовательностей (Z- и a'-участки на рис. 6.4).

Бламберг и Колаковский [16, 17] использовали эти наблюдения для обоснования модели [103], согласно которой концентрация белка N регулирует относительные уровни транскрипции и репликации вирусных нуклеокапсидов с негативным геномом; последние служат матрицами для синтеза мРНК или для репликации, используя при этом один и тот же вирусный полимеразный комплекс. При высокой концентрации белка N репликация разрешена, так как синтезирующаяся (незаконченная) РНК-лидер способна немедленно включаться в образующийся нуклеокапсид, в результате чего подавляется остановка полимеразы на границе лидерного участка и гена белка N, а также на всех последующих межгенных границах. Если концентрация белка N недостаточна для быстрой инициации сборки на 5'-конце новосинтезируемой РНК, сигнал терминирования не репрессируется и полимеразный комплекс осуществляет терминацию по завершении синтеза 5'-лидерной РНК, которая сходит с матрицы (и может со временем инкапсидироваться). Теперь полимеразы свободны и могут скользить вдоль матрицы по направлению 3'→5', по очереди иницируя и терминируя синтез каждой из мРНК для белков N, NS, M, GnL. Эти мРНК не имеют последовательностей нуклеации и поэтому отделяются от матрицы в виде свободных мРНК, готовых принять участие в трансляции.

Описанная выше простая модель не может объяснить все события, происходящие в процессе переключения транскрипции на репликацию, только лишь уровнем белка N [57]. Механизмы транскрипции генома VSV [7, 8] и его репликации [36, 57] полностью еще не выяснены. Не исключено, что белок N вместе с некоторыми ассоциированными с репликазой вирусными белками участвует в переключении с транскрипции на репликацию и играет важную роль в интерферирующем эффекте ДИ-частиц, а также в относительно высокой конкурирующей способности ДИ-частиц стволового типа по сравнению с частицами нестволового типа. Ясно, что для образования конкурентоспособных

ДИ-частиц необходим как участок инициации репликации, так и участок нуклеации инкапсидации.

Структура ДИ-геномов других РНК-содержащих вирусов

Представленная в этой главе детальная информация о ДИ-частицах VSV стала доступной благодаря их тщательному изучению как в биологическом, так и в биохимическом отношении. Об аналогичных структурных принципах, способах образования и механизмах амплификации и интерференции можно говорить и в связи с другими изученными РНК-содержащими вирусами. Приведем несколько примеров для иллюстрации сходства и различия.

Вирус Сендай

Этот представитель вирусов парагриппа относится к РНК-содержащим вирусам с негативным геномом. Его ДИ-частицы образуются довольно легко. Они имеют обширные делеции [80, 89] и их репликативная и интерферирующая способности зависят от типа клетки-хозяина. По структуре генома и по механизмам интерференции ДИ-частицы вируса Сендай напоминают ДИ-частицы VSV. Первым доказательством наличия стволовых последовательностей (инвертированной концевой комплементарности) у ДИ-частиц было электронно-микроскопическое выявление Колаковским и др. в 1976 г. кольцевых форм ДИ-РНК вируса Сендай [90]. Они показали, что циклизация ДИ-РНК обусловлена стволами длиной 110—150 нуклеотидов; при этом, так же как у VSV, вирусный 3'-конец был замещен комплементарной копией 5'-концевого участка. Кроме того, основная часть РНК ДИ-геномов гомологична большему или меньшему участку 5'-конца вирусного генома в зависимости от размера ДИ-частицы [90, 91, 102]. Таким образом, ДИ-частицы главного типа вируса Сендай напоминают ДИ-частицы главного типа VSV (1-й стволовой структурный тип, см. рис. 6.4). ДИ-частицы с внутренней делецией также широко распространены [80].

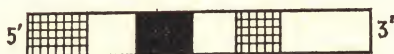
Вирусы гриппа

Другим РНК-содержащим вирусом с негативным геномом, образующим ДИ-частицы тех же типов, которые характерны для VSV, является вирус гриппа. В отличие от VSV и вируса Сендай вирус гриппа содержит сегментированный геном, состоящий из восьми независимых генов. Более того, вирус гриппа отличается и по инициации транскрипции, при которой 5'-фрагменты мРНК клетки-хозяина используются в качестве затравки для транс-

крипции каждого сегмента [94, 114]. Свойства и структура вируса гриппа рассмотрены в обзоре Наяка и др. [112]. Основная часть наблюдаемых ДИ-частиц вируса гриппа происходит из одного из трех больших сегментов вирусной РНК, кодирующих вирусную полимеразу (сегменты P_1 , P_2 , P_3), и большинство этих частиц образуется в результате внутренних делеций при сохранении 3'- и 5'-концов вирусной РНК. Поэтому они напоминают тип 3 частиц с внутренними делециями у VSV (рис. 6.4); подобно этому редкому типу ДИ-частиц VSV, они способны транскрибировать делетированные, мРНК-подобные молекулы, содержащие полиаденилированные последовательности. Однако эти «мРНК» ДИ-частиц вируса гриппа с внутренними делециями способны кодировать только значительно делетированные молекулы полимеразного белка [112]. Еще неизвестно, транслируются ли эти делетированные молекулы «мРНК» с образованием белков и могут ли они или их aberrантные белковые продукты играть роль в ДИ-интерференции. Бей и Рейхман [12] наблюдали подавление первичной транскрипции VSV ДИ-частицами того же вируса, принадлежащими к частицам типа 3 с внутренними делециями. Наяк и др. [112] предположили, что ДИ-частицы вируса гриппа «внутреннеделеционного» типа могут интерферировать путем образования aberrантных транскриптов и (или) aberrантных продуктов трансляции. Чанда и др. [24] просеквенировали ДИ-частицы двух видов вируса гриппа и показали, что они относятся к простому типу частиц с внутренней делецией, точно сохраняющих последовательности на обоих 5'- и 3'-концах. Они нашли также, что последовательности в точках делеции и примыкающих к ним участках не похожи на характерные для сплайсинга участки (consensus) последовательностей мРНК эукариот [24]. Две группы исследователей [37, 157] также показали отсутствие сходства последовательностей в точках делеции ДИ-частиц VSV с участками, характерными для сплайсинга. Эти факты свидетельствуют о том, что механизм образования этих ДИ-частиц основан скорее на ошибках репликации, а не на традиционном сплайсинге РНК и что для «прыжков» репликазы не требуются определенные последовательности.

Кремpton и др. [34] показали, что некоторые ДИ-частицы могут возникать также и из других сегментов РНК, помимо P_1 , P_2 и P_3 . Филдс и Винтер представили полную нуклеотидную последовательность исключительно сложной ДИ-частицы вируса гриппа, имеющей мозаичную структуру [46]. Схематично структура генома этой ДИ-частицы представлена на рис. 6.7, А. Ясно, что эта ДИ-частица произошла из пяти отдельных участков концевых областей сегмента P_3 и одного участка сегмента P_1 . Три участка из сегмента P_3 , происходящие из 3'-концевой части вирионного сегмента, расположены попеременно с двумя участками, происхо-

А



Б



Рис. 6.7. Сложная мозаичная структура двух своеобразных ДИ-геномов вируса гриппа (А) и вируса леса Семлики (SFV) (Б). Мозаичные структуры, представленные здесь, схематически построены на основе секвенирования ДНК (кДНК-клонов) вируса гриппа [46] и SFV [101]. ДИ-геном вируса гриппа (А) составлен из трех участков (белые блоки) 3'-концевой части Р₃-сегмента восьмисегментного генома вируса. Два участка (блоки в клеточку) происходят из 5'-концевой части Р₃-сегмента и один участок (центральный черный блок) из другого сегмента вирусного генома (Р₁-сегмента). Этот ДИ-геном, вероятно, образовался в результате множественных «прыжков» репликазы, причем по крайней мере в одном из них она переходила с одной молекулы РНК-матрицы на другую и обратно [46]. Б. ДИ-геном SFV содержит уникальные 3'- и 5'-вирусные концы, но его 5'-концевая кэп-последовательность изменена [127]. Кроме того, в него входят три идентичные последовательности (повторы) из 484 оснований (черные блоки). Один из этих повторов прерван на 128 оснований уникальной вставкой (блок со стрелкой), за которой следуют оставшиеся 356 из 484 оснований повтора (ближе к 3'-концу). Ясно, что образование этого ДИ-генома происходило с многочисленными перестройками (репликативными ошибками?) вирусного генома [101].

дящими из 5'-концевой части. Один участок сегмента Р₁ (черный прямоугольник на рис. 6.7, А), происходящий из 5'-концевой части, вставлен между двумя участками Р₃, возникшими из 3'-конца. Эта необычная структура последовательностей привела Филдса и Винтера [46] к следующим предположениям. а) ДИ-РНК образовалась во время синтеза плюс-цепи с помощью механизма, при котором вирусная полимераза останавливалась на последовательностях, богатых уридином, а затем «прыгала», чтобы возобновить синтез на другом участке, возле другого конца

родительской матрицы. При этом 3'- и 5'-концы РНК-матрицы должны быть расположены рядом, например благодаря «складыванию» молекулы, позволяющему полимеразному комплексу попеременно «прыгать» туда и обратно (в том же или другом цикле репликации). б) Встраивание одного участка из сегмента P_1 происходит в момент, когда полимеразный комплекс «прыгает» с одного сегмента на другой (возможно, во время параллельного сближения 5'- и 3'-концов), а затем обратно (в том же или другом цикле репликации). в) Такой же механизм полимеразных прыжков может привести к образованию вставок и делеций в генах поверхностных антигенов вируса. ДИ-частицы предоставляют первое четкое доказательство межмолекулярных рекомбинаций в РНК-геномах, основанное на данных секвенирования.

Сложная перестройка генов, рассмотренная выше, позволяет предположить возможность возникновения множества чрезвычайно причудливых ДИ-частиц, но, по-видимому, преобладающими являются конкурентоспособные частицы, прошедшие наиболее жесткую селекцию структуры, и именно они доступны для изучения.

Пикорнавирусы

Ранние работы Коула и Балтимора с сотрудниками [26—29] на вирусе полиомиелита позволили предположить, что его ДИ-частицы представляют собой мутанты с внутренними делециями, у которых отсутствует около 15% генома. Делетированные участки генома кодируют часть полицистронного белка-предшественника, который затем нарезается с образованием капсидных белков. Позднейшее картирование гетеродуплексов подтвердило, что делеция большей части генома ДИ-частиц вируса полиомиелита локализуется на 5'-конце плюс-цепи вирусной РНК на участке, кодирующем капсидные белки [105, 115]. Однако эти геномы ДИ-частиц представляют собой гетерогенную популяцию, и положение делетированных участков варьирует (500—3000 оснований от 5'-конца). Некоторые ДИ-геномы имеют одну делецию, другие две или три [105, 115]. Мак-Клур и др. [108] показали, что в различных штаммах вируса полиомиелита воспроизводимо образуются более крупные (до 16%) или меньшего размера (всего 4%) делеции родительского генома. Несколько клинических изолятов вируса полиомиелита и штамм вируса Менго регулярно образуют делеции, составляющие только 4—6% генома. Вероятно, ограничения упаковки диктуют пределы величины делеции, которые могут быть совместимы с инкапсидацией. Неясно, почему до сих пор не обнаружены частицы с делециями на половине генома, прилежащей к 3'-концу. Непонятно также, как образуются ДИ-частицы пикорнавирусов и почему

они начинают преобладать над стандартным вирусом. Самым простым и наиболее вероятным механизмом образования мутантов с внутренними делециями является «проскальзывание» или «прыжки» полимеразы вдоль одной матричной молекулы (как обсуждалось выше для VSV). Механизм их накопления и интерференции [27] требует дальнейших исследований. В выяснении этого вопроса должно помочь клонирование отдельных ДИ-частиц в сочетании с биологическими исследованиями, а также молекулярное клонирование и секвенирование.

Альфовирусы

Структура ДИ-частиц вируса Синдбис и вируса леса Семлики рассмотрена в обзоре Столлара [149]. Несмотря на довольно сложную стратегию репликации, используемую этими вирусами с позитивным геномом (гл. 4), многие их ДИ-частицы представляют собой мутанты с внутренними делециями различных размеров [40, 51, 154]. Самые мелкие ДИ-частицы, по-видимому, возникают в результате делеций вирусных последовательностей из ранее появившихся ДИ-частиц, так как во время продолжительной серии неразведенных пассажей размеры геномов ДИ-частиц постепенно уменьшаются от больших до промежуточных, а затем до минимальных. Большая часть этих ДИ-частиц, очевидно, сохраняет 5'- и 3'-концы плюс-цепи, включая 5'-кэп-структуру, и poly(A) на 3'-конце; вероятно, в каждую ДИ-частицу упаковывается по несколько ДИ-геномов [40, 79, 86].

В противоположность относительно простой схеме внутренних делеций, обнаруженных упомянутыми выше авторами, Петтерсон с коллегами получил довольно причудливые ДИ-геномы из популяций вируса леса Семлики [79, 93, 127]. Они секвенировали почти полную длину клонированной копии кДНК и нашли, что она имеет тройной повтор, фланкированный полиаденилированной 3'-концевой вирусной последовательностью и уникальным 5'-концом с перестроенными последовательностями в кэп-структуре. Этот необычный ДИ-геном схематически представлен на рис. 6.7, Б. Следует отметить, что один из трех повторов, состоящих из 484 оснований, прерывается на 128 основании уникальной вставкой из 60 оснований. Механизм образования этого сложного мозаичного ДИ-генома неясен, но множественные делеции и удвоения образуются, вероятно, в результате ошибок репликазы и (или) других рекомбинационных событий. Указанная группа исследователей регулярно наблюдает у вируса леса Семлики [79] ДИ-геномы такого, а также сходного мозаичного типа и не обнаруживает, подобно другим исследователям (см. выше), простых делеционных типов. Однако они не клонировали свою исходную вирусную популяцию повторно и начали неразведенные

пассажи прямо с материала из бляшки, содержащего вирус в низком титре. Момент клонирования очень важен для получения разнообразных новых типов ДИ-геномов, так как во всех клонированных препаратах вирусов Сендай и VSV (и, вероятно, многих других вирусов) с высоким титром обнаруживается много новообразованных ДИ-частиц [60, 91]. В любом случае наличие этих повторяющихся последовательностей в различных ДИ-геномах альфавирусов позволяет предположить, что они вносят свой вклад в конкурентоспособность ДИ-частиц. Они могут содержать повторяющиеся участки инициации репликации и (или) участки нуклеации инкапсидации. Как будет видно ниже, в ДИ-геномах ДНК-содержащих вирусов повторяющиеся участки начала репликации обнаруживаются довольно часто.

Реовирусы

Эти вирусы, содержащие двухцепочечную сегментированную РНК, также легко образуют и накапливают ДИ-вирусные частицы. Во многих независимых клонах реовируса 3-го типа показано [116] присутствие ДИ-частиц, у которых недостает вирионного фрагмента L_1 , кодирующего полимеразу. Обнаружены также ДИ-частицы, дефектные по другим сегментам генома [3, 137]. Интересно, что недефектные сегменты ДИ-частиц реовируса могут нормально транскрибироваться и комплементировать другие мутанты реовирусов [144], а также участвовать в обычном генетическом перераспределении сегментов [1, 2]. Мало что известно относительно структуры, способа образования, транскрипционной способности или механизмов интерференции реовирусных сегментов генома, имеющих делеции, однако можно надеяться, что в ближайшем будущем исследования по молекулярному клонированию помогут ответить на эти вопросы.

Ретровирусы

Ретровирусы — это РНК-содержащие вирусы, замечательные тем, что с их вирионным геномом ассоциирована обратная транскриптаза, которая синтезирует провирусную ДНК. Их геномы способны к интеграции или рекомбинации на уровне ДНК или во время обратной транскрипции. Происходящие при этом рекомбинационные события могут приводить к образованию дефектных геномов путем рекомбинации с мРНК или ДНК клетки-хозяина. Дефектные геномы РНК-содержащих опухолеродных вирусов относятся к наиболее интенсивно исследуемым эукариотическим генам, так как они вызывают опухолевую трансформацию через *onc*-гены клетки-хозяина, которые попадают под регулирующее влияние вирусов [15, 113].

ДНК-содержащие вирусы

Образование дефектных геномов ДНК-содержащих вирусов может происходить любым из тщательно исследованных за последние годы способов перестройки ДНК. Некоторые из рекомбинационных событий, возможно, происходят в результате аберрантной репликации вируса, другие могут быть результатом транспозонных скачков, гомологичной рекомбинации и т. д. В связи с тем что подробно изучены на биологическом и молекулярном уровне лишь немногие из ДИ-частиц ДНК-содержащих вирусов, в этой главе рассмотрены только несколько характерных примеров.

Паповавирусы

Натанс с сотрудниками [23, 52, 100] и другие исследователи [49, 117, 118, 120] тщательно охарактеризовали ДИ-геномы паповавирусов: SV40 и полиомы. Их данные обобщены в обзоре и нескольких статьях [22, 44, 49]. У паповавирусов наблюдается широкое разнообразие структур ДИ-геномов. Почти все они содержат вирусные участки инициации репликации («origin»), причем у многих эти участки чередуются с участками ДНК клетки-хозяина. Перестроенные ДНК-геномы по размеру почти равны родительской вирусной ДНК, так что они могут инкапсидироваться. Ли и Натанс четко показали [100], что скорость репликации ДИ-генома SV40 относительно своего вируса-помощника является экспоненциальной функцией числа участков инициации репликации в ДИ-геноме. Они провели тщательное сравнение ДИ-геномов, имеющих разное число таких участков. Авторы показали также, что эффективность инкапсидации не коррелирует с их числом. Ни для одного из ДИ-геномов не обнаружено увеличения активности инкапсидации, но известен один ДИ-геном, который инкапсидируется со значительно меньшей эффективностью, чем стандартный вирус-помощник SV40 [100].

Вероятно, в делециях, заменах, дупликациях, ведущих к образованию различных ДИ-геномов, участвует несколько механизмов рекомбинации ДНК. Приобретение ДИ-геномом фрагментов ДНК клетки-хозяина, по-видимому, связано со способностью этих вирусов интегрировать с ДНК клетки-хозяина, но это еще до конца не выяснено [120]. Норкин и Тиррелл [117] показали, что весьма разнообразный набор ДИ-частиц SV40 может образоваться из бляшечного изолята, достоверно свободного от ДИ-частиц. Многие из ДИ-частиц содержат повторяющиеся участки начала репликации (ДИ-геномы этого класса, вероятно, накапливаются быстрее других), а некоторые—последовательности ДНК клетки-хозяина. Но все-таки авторы полагают, что у SV40 нет

тенденции к преимущественному образованию каких-либо вариантов или классов вариантов ДИ-частиц.

О'Нейл и др. [118] выделили ДИ-частицы SV40 двух интегральных видов из персистентно зараженных клеток. ДИ-частицы одного из них содержали все или почти все ранние последовательности SV40, фланкированные множеством участков начала и конца репликации, а ДИ-частицы другого — поздние последовательности SV40, также фланкированные множеством таких участков. Несмотря на то что ДИ-частицы этих двух видов инкапсидированы раздельно, вместе они могут продуктивно заражать клетки почек обезьян в отсутствие полного стандартного вируса. Молекулярные клоны этих ДИ-геномов показали такую же зависимость друг от друга при продуктивной трансфекции. В сущности эти два дефектных генома SV40 представляют собой новый двухсегментный инфекционный вариант вируса SV40, возникший и отобранный в процессе персистентной инфекции. Очевидно, их ранние и поздние гены транскрибируются и комплементируют друг друга достаточно эффективно, для того чтобы взаимно поддерживать репликацию и инкапсидацию. По-видимому, присутствие множества участков терминации предотвращает подавление эффективной транскрипции, вызываемое множеством участков инициации, благодаря чему сохраняются репликативное преимущество и способность к индукции вирусной интерференции, обеспечиваемые множеством участков инициации репликации [118]. Ясно, что эти ДИ-частицы должны быть способны к эволюции независимо от стандартных геномов SV40, а также к интерференции и генетическому взаимодействию с ними.

Джонсон и др. [7] проанализировали нуклеотидные последовательности рекомбинационных соединений у 16 ДИ-частиц SV40 и на основании этих данных в сочетании с известными последовательностями вирусного генома восстановили родительские последовательности, участвующие в каждом рекомбинационном событии. Они не нашли сходства последовательностей на концах разных делеций или выраженной гомологии между родительскими последовательностями, соседствующими с делециями. Поэтому эти авторы исключили гомологичные рекомбинации и любые сайт-специфические рекомбинационные механизмы. Они предположили, что вероятным механизмом образования дефектных геномов SV40 являются репарация и лигирование линейных ДНК, образующихся под действием неспецифических клеточных нуклеаз.

И наконец, следует отметить, что полученные методом генной инженерии дефектные геномы SV40, содержащие встроенные чужеродные гены, стали важным инструментом молекулярного клонирования в эукариотических клетках.

Герпесвирусы

Очень большие сложные геномы герпесвирусов также легко образуют ДИ-частицы, содержащие делеции, перестройки и повторы вирусных последовательностей. Имеются сообщения о наличии ДИ-геномов у ряда герпесвирусов, в том числе у вируса простого герпеса (*herpes simplex virus*, HSV) [48, 150, 151], вируса герпеса лошадей [35, 56], цитомегаловируса [148] и т. д. Френкель и др. охарактеризовали сегменты вирусного генома, необходимые ДИ-частицам вируса герпеса для того, чтобы они могли эффективно реплицироваться и инкапсидироваться [150, 151]. Все ДИ-частицы HSV, которые были исследованы, содержат повторяющиеся последовательности ДНК, включающие фрагменты концевой участка S-плеча генома. При введении путем трансфекции в зараженные стандартным вирусом-помощником клетки мономерных повторов с мол. массой $5,5 \cdot 10^6$, отщепленных от повторяющихся последовательностей ДИ-генома, исходные мономерные единицы реплицировались и регенерировали конкатемеры размером в полный геном (мол. масса $100 \cdot 10^6$), состоящие из исходных повторов, собранных по принципу «голова — хвост» [150]. Это, вероятно, является результатом поддерживаемой вирусом-помощником репликации по механизму катящегося кольца.

Дальнейшие исследования показали, что кроме повторов, содержащих участки начала репликации, в состав геномов ДИ-частиц входят сигнальные последовательности, кодирующие расщепление конкатемеров вирусной ДНК для упаковки. Отщепленные повторяющиеся единицы с размерами от $5,5 \cdot 10^6$ Да (мономеры) до размера полного генома (дефектные конкатемеры) обнаружены упакованными в капсиды, накапливающиеся в ядре [151]. Однако покрываются оболочкой и переносятся в цитоплазму как зрелые капсиды только дефектные конкатемеры размером в полный геном ($\sim 100 \cdot 10^6$ Да). Механизм столь избирательного созревания неясен. Связь между расщеплением и морфогенезом прослеживается также у вируса псевдобешенства [95]. Спэт и Френкель [143] использовали повторяющиеся единицы дефектных геномов HSV, для того чтобы получить клонирующий вектор, который в присутствии HSV-помощника может в эукариотических клетках реплицировать большую вставку чужеродной ДНК. Этот вектор является химерой повторяющихся ДИ-единиц HSV, присоединенных к бактериальной плазмиде pKc7, что делает возможным его перенос от бактерий к эукариотическим клеткам и обратно.

Несмотря на различия в механизмах репликации и рекомбинации между ДНК-содержащими и РНК-содержащими вирусами, в основе как образования, так и амплификации ДИ-частиц ле-

жат сходные принципы. В обоих случаях имеет значение конкуренция на уровнях репликации и инкапсидации, а также другие возможные факторы.

Другие ДНК-содержащие вирусы

Парвовирусы также могут образовывать ДИ-частицы. Их небольшие ДНК-геномы реплицируются с помощью необычного механизма, не требующего ни циклизации ДНК, ни РНК-праймирования. В участок инициации репликации входят автокомплементарные 3'-концы (и 5'-концы), которые могут образовать шпильку для праймирования репликации генома с 3'-конца с последующим расщеплением цепи ДНК и достройкой ДНК для восстановления концевой участка шпильки [145] (гл. 4). Геномы ДИ-частиц этих вирусов имеют внутренние делеции и сохраняют концевые шпильки, поэтому наблюдаются «шпилькообразные» дефектные ДНК-геномы [38, 45]. Сателлитный парвовирус AAV [145] был модифицирован в лаборатории с целью получения мутантов с внутренними делециями, несущих чужеродную ДНК, и эти мутанты в дальнейшем использовали в эукариотических клетках в качестве клонирующих векторов.

У поксвирусов ДИ-частицы не обнаружены. Долгое время считали, что аденовирусы не способны их формировать, но недавно ДИ-частицы были обнаружены у аденовирусов мышей. Разнообразие ДИ-частиц с различной величиной делеций очень велико; некоторые из них энергично интерферируют с аденовирусом-помощником, в то время как другие содержат вирусную ДНК со вставками клеточной ДНК. По-видимому, интерференция связана с избирательным репликативным преимуществом ДИ-частиц над вирусом-помощником. В противоположность этому дефектный геном аденовируса человека типа 12, охарактеризованный другой группой авторов, упаковывается более эффективно, чем стандартный вирус-помощник, но не имеет очевидных преимуществ репликации [39]. Он содержит также клеточную ДНК, встроенную в дефектную вирусную ДНК.

В заключение можно сказать следующее. Множество РНК- и ДНК-содержащих вирусов образуют ДИ-частицы, характеризующиеся большим разнообразием. По-видимому, в соответствующих условиях ДИ-частицы может давать любой вирус. В связи с тем что число различных форм ДИ-частиц велико, часто не удается их идентифицировать или доказать их отсутствие. Например, Руиз-Опазо и др. [134] недавно сообщили, что печень шимпанзе, зараженная вирусом гепатита В, и частицы Дейна из сыворотки людей-носителей содержат линейные и сверхспиральные формы вирусной ДНК. Они предположили, что сверхспиральные формы представляют собой инфекционный вирус, а

присутствующие в большом количестве линейные формы — ДИ-частицы или интерферирующие неинфекционные формы. Доказать или опровергнуть это предположение довольно трудно, если нет чувствительной клеточной культуры, допускающей количественные исследования.

Биологическая роль дефектных геномов

Перенос генов и экспрессия

Трансдукция генов от хозяина к хозяину

Среди наиболее очевидных и важных ролей ДНК-содержащих вирусов и ретровирусов следует признать их участие в трансдукции генов, при которой дефектный вирус несет последовательности ДНК клетки-хозяина (см. выше). Такие разные вирусы, как специализированные трансдуцирующие фаги, дефектные РНК-содержащие опухолеродные вирусы, несущие *onc*-гены, папавирусы и аденовирусы, способны переносить гены клетки-хозяина в заражаемые клетки. У обычных трансдуцирующих фагов или у псевдовироионов нет необходимости в каких-либо вирусных последовательностях для переноса в другие клетки ДНК клетки-хозяина, инкапсидированной в вирусную оболочку. В отдельных работах сообщается, что обычные РНК-содержащие вирусы могут содержать клеточную ДНК, но нет никаких генетических доказательств, что они (за исключением ретровирусов) переносят ДНК-гены из одной клетки в другую.

Конверсия генов дефектными бактериальными вирусами

В классических исследованиях бактериофагов было показано, что определенные интегрированные гены профагов способны экспрессироваться их хозяевами-бактериями и оказывать на них значительное влияние. Часто это не зависит от того, дефектен или интактен геном фага. Рассмотрим на примере фага λ лучше других изученный случай лизогенной конверсии — иммунитет к суперинфекции, осуществляемый репрессором. Синтезированный интегрированными генами провируса γ -репрессор обеспечивает иммунитет клеток хозяина к суперинфекции фагами альфа или близкими к ним фагами. Иммунитет осуществляется на внутриклеточном уровне с помощью связывающегося с участком оператора репрессорного белка, регулирующего транскрипцию фага. В механизме молекулярного переключения участвует также белок «сго», связывающийся с тем же участком [78].

Иммунитет [9, 20] обусловлен тем, что продукты генов про-

фага изменяют структуру и функции компонентов поверхности бактериальной клетки, предотвращая таким образом присоединение и (или) проникновение гомологичных фагов. Интегрированные гены фага либо прямо изменяют поверхностные молекулы, образуя новые ферменты или изменяя существующие, либо действуют косвенно — подавляя синтез или модификацию поверхностных компонентов бактериальной клетки. Эпсилон-фаги сальмонелл вызывают большие изменения олигосахаридных боковых цепей липополисахаридов данных бактерий. При этом изменяется не только чувствительность бактерий к фагу, но и антигенные свойства и другие виды биологического взаимодействия с окружающей средой [9].

Конверсия клеток генами вирусов животных

Как ДНК-, так и РНК-содержащие онкогенные вирусы вызывают глубокие изменения в поведении клеток, которые мы называем злокачественными. Весь геном редко необходим для такой трансформации, часто достаточно дефектного генома. Например, первичная культура клеток почек новорожденных крыс может быть трансформирована левым концевым фрагментом (7,2%) генома аденовируса типа 12 [76]. Другой пример дают геномы, кодирующие Т-антигены паповавирусов или дефектные геномы ретровирусов [15, 113]. Опухолевая трансформация, являющаяся выраженным и легко селекционируемым признаком экспрессии генов дефектных вирусов, была широко исследована. Вероятно, клеточные изменения способны вызывать многие гены вирусов животных, особенно гены больших ДНК-содержащих вирусов, если они присутствуют в виде интегрированных дефектных геномов. При изучении трансформации клеток человека, например, в качестве экспрессируемого генетического маркера широко используют ген тимидинкиназы HSV. Роль других фрагментов вирусного генома может быть менее выраженной. Например, Мокарски и Ройzman [110] нашли доказательство транс-действия продукта гена HSV, участвующего в осуществлении инверсии L- и S-компонентов генома HSV. Эти и сходные гены могут иногда вызывать инверсии и транслокации клеточной хромосомной ДНК, влияющие на экспрессию клетки-хозяина аналогично транспозоноподобному действию интегрированных участков длинных концевых повторов ретровирусов [15, 113]. Для того чтобы вызвать эффект конверсии, дефектные вирусные геномы необязательно должны быть интегрированы. Некоторые достигают внутри клетки персистентного реплицируемого плазмидоподобного состояния благодаря присутствию полноценного вируса-помощника или без него [35, 92, 158]. Ниже мы рассмотрим несколько примеров таких геномов.

ДИ-частицы и вирусы-сателлиты как фактор регуляции летальности, вызванной вирулентным вирусом

Хуанг и Балтимор [68] первыми предположили, что ДИ-частицы могут ослаблять естественную вирусную инфекцию, поскольку им присущи избирательная репликация и выраженная интерференция с вирусом-помощником. Однако при естественном протекании вирусных заболеваний у человека или животных присутствие ДИ-частиц и их влияние на этот процесс доказать пока не удалось. Это связано главным образом с техническими трудностями такого доказательства. Однако в многочисленных исследованиях показано, что ДИ-частицы могут формироваться и накапливаться в организме зараженных лабораторных животных, что они могут защищать животное от болезни и гибели, вызываемых гомологичным вирусом, и что они могут предотвращать вызываемую вирусом гибель клеток в культуре ткани. Защита против цитопатического действия предрасполагает некоторые клетки к длительной персистентной инфекции *in vitro*, при которой зараженные клетки нормально размножаются, в то время как внутриклеточный вирус и геномы ДИ-частиц реплицируются, регулируя друг друга. Существует обзор этих биологических исследований [61]. Результаты в целом позволяют предположить, что ДИ-частицы обеспечивают защиту от болезни и смерти по крайней мере при некоторых естественных вирусных инфекциях. ДИ-частицы, вероятно, позволяют также ряду вирусов находиться в клетках некоторых типов в скрытом состоянии и благодаря этому сохраняться в организме животного длительное время. Например, Попеску и Леман-Грубе [129] обнаружили многочисленные ДИ-частицы во многих тканях мышей, персистентно зараженных вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCM); то же нашли Спандидос и Грехем [144] в организме новорожденных крыс, персистентно зараженных реовирусом.

Если в клетках некоторых типов ДИ-частицы действуют *in vivo* так же сильно, как *in vitro*, то неудивительно, что они оказывают ослабляющее действие на острую инфекцию. Сикелик и Маркус [138] измерили интерференцию ДИ-VSV в культуре единичных клеток и наблюдали феномен «все или ничего». Большая часть клеток, получавших ДИ-частицы вместе с вирусом-помощником, не продуцировала инфекционного вируса, так что репликация ДИ-частиц вела к полной остановке репликации зрелого вируса.

Есть и другие факторы, играющие важную роль в развитии персистенции вирусной инфекции в клетках и в организме животного. Например, в одних системах важны *ts*-мутации и интерферон [159], в других случаях оказываются критическими делеции

или мутации определенных генов [2], причем для всех РНК-содержащих вирусов характерны множественные генные мутации [62]. Важную роль могут играть мутации клетки-хозяина [4], тип ее дифференцировки и способность хозяина к иммунному ответу. В любом случае значение персистентных вирусных инфекций в развитии хронических и злокачественных заболеваний человека и животных все возрастает [62, 147], и ДИ-геномы при этом, несомненно, играют не последнюю роль. Например, в культурах клеток эмбриона хомячка, персистентно зараженных и трансформированных вирусом герпеса лошадей типа 1 и его ДИ-частицами, постоянно годами образуются как вирус, так и ДИ-частицы, что позволяет предположить участие ДИ-частиц в инициации и поддержании персистентного и трансформированного состояния клеток [35]. Свободные неинтегрированные дефектные вирусные ДИ-геномы автономно реплицируются в опухолевых клетках хомячков, трансформированных папавирусом ВК человека [158]; дефектные неинтегрированные кольцевые молекулы ДНК герпесвируса обезьян саймири и герпесвируса обезьян ателес были найдены в клетках лимфоидных линий, происходящих из тканей опухолей, индуцированных вирусом [92].

Как обсуждалось выше, сателлитные вирусы, подобные ДИ-частицам, могут влиять на продукцию вируса и проявления болезни у растений, но их роль в окружающей среде остается в значительной степени неизученной. Роль сателлитных вирусов животных и человека еще более неясна, однако есть основания полагать, что в будущем десятилетии мы достигнем лучшего понимания действия ДИ-частиц и вирусов-сателлитов на их хозяев в природных условиях.

Участие дефектных геномов в эволюции вируса и клетки-хозяина

Независимая модульная эволюция вирусных генов

Наиболее наглядно участие дефектных геномов в эволюции клетки-хозяина демонстрируется генной трансдукцией и вирусной конверсией генов, приводящих к внесению и рекомбинации новой генетической информации или усилению перестройки хозайских хромосом (см. выше). Так же как ДНК дефектных ретровирусов может приобретать гены клетки-хозяина и превращать их в часть своего генома, под действием генов дефектного вируса клетка может либо постоянно включать его полезный ген в свою хромосому, где он целиком находится под клеточным контролем, либо путем рекомбинации переносить ген или группу генов в геном суперинфицирующего родственного, но отличающегося фага.

Ботстайн и Сасскайнд [20] предложили общую модульную теорию эволюции вирусов, согласно которой эволюция действует

первично не на уровне интактных вирусов, а на уровне индивидуальных функциональных единиц (модулей). Каждый модуль кодирует полезную функцию или обеспечивает протекание определенного процесса, например инкапсидацию фага, образование хвоста фага, раннюю и позднюю регуляцию, репликацию, иммунные реакции или реакции, связанные с лизисом клетки. Согласно этой теории, в природе каждый интактный вирус является продуктом не одной линии эволюции, а благоприятной комбинации генных модулей, которые успешно занимают индивидуальную нишу в природе. Отбор на уровне индивидуальных модулей идет по признакам: а) хорошей функции, б) сохранения прилежащих последовательностей (для обеспечения соответствующего места в любых вирусах скрещивающейся вирусной популяции и для собственно регуляции) и в) функциональной совместимости с максимальным количеством комбинаций других независимых модулей. Очевидно, в этой картине эволюции вирусов геномы дефектных вирусов (и включенные в них модули) помещаются в glavное русло эволюции.

Ботстайн и Сасскайд [20] приводят многочисленные примеры структурно различающихся модульно-связанных фагов. Теорию независимой модульной эволюции подтверждают некоторые фаги, которые заражают очень разные группы бактерий. К тому же она помогает объяснить двустороннюю систему иммунитета, найденную у фага P22. После заражения клеток (даже таких, в которых не могут функционировать один или несколько модулей P22) антирепрессор (imm I), связанный со вторичной иммунной системой P22, индуцирует функцию всех модулей резидентного профага. Это обеспечивает не только функцию, которую P22 не в состоянии проявить в этих клетках, но и репликацию резидентного профага, что позволяет обмениваться его модулями с модулями P22 с образованием нового фага, обладающего избирательными преимуществами в клетках данного хозяина. Ботстайн и Сасскайд [20] предположили, что аналогичным образом могут эволюционировать многие вирусы животных. Действительно, уже ясно, что РНК-содержащие вирусы с сегментированным геномом, такие как вирусы гриппа и реовирусы, обмениваются своими генами (гл. 9). Такой обмен (реассортация) возможен между дефектными и инфекционными вирусами. Гомологичные и негомологичные рекомбинационные события на уровне ДНК допускают такие обмены модулями между ретровирусами и между ДНК-содержащими вирусами и их дефектными геномами независимо от того, являются ли они свободными или встроены в хромосомы хозяина. Наконец, обмен модулями может происходить с некоторой (возможно, очень низкой) частотой даже между РНК-содержащими вирусами с несегментированным геномом. Существование мозаичных ДИ-частиц, секвенированных Филд-

сом и Винтером [46], доказывает возможность истинных внутримолекулярных рекомбинаций РНК (см. выше), что подтверждает результаты генетических исследований рекомбинаций между геномами РНК-содержащих вирусов [31, 87].

Последовательный отбор вирусных мутантов, устойчивых к популяции эволюционирующих ДИ-частиц

Во время персистентной инфекции, обусловленной интерференцией ДИ-частицами, появляются мутанты инфекционного вируса, значительно более устойчивые к интерференции, чем использованный для создания персистенции исходный вирус. Это довольно общее явление для РНК-содержащих вирусов можно проследить на примере вируса бешенства [81], VSV [63], альфавирусов [75] и вируса LCM [74]. Аналогичный ДИ-отбор недавно описан для ДНК-содержащих фагов [42]. Такой отбор происходит повторно, а возможно, и постоянно во время персистентной инфекции и во время серийных неразведенных пассажей в результате того, что новая популяция ДИ-частиц постоянно эволюционирует. Это ведет к образованию новых вирусных мутантов, устойчивых к новым ДИ-частицам [64, 65]. Очевидно, популяциями ДИ-частиц специфическим образом отбираются белки репликазы вируса и участки инициации ее гена на концах РНК-генома [42, 65, 66]. Однако любые силы отбора, способные нарушить равновесное доминирование определенного варианта вируса (дикого типа или мутанта) в популяции, могут усилить эволюцию всех цистронов вируса, допуская появление вариантов, которые ранее оказались бы неконкурентоспособными. Эта проблема рассмотрена в обзоре Холланда и др. [62]. Таким образом, ДИ-частицы могут способствовать возникновению разнообразия в популяции и быстрой эволюции вирусных РНК-геномов, из которых они произошли.

Краткое содержание

Дефектные геномы представляют собой субгеномные делеционные мутанты вирусов, из которых они образовались. Это не просто временные побочные продукты репликации вируса, но скорее субгеномные модули, которые могут оказывать разнообразное и важное биологическое и эволюционное воздействие. Вирулентность является общим и полезным признаком всех вирусов, способствующим их быстрому распространению и накоплению в больших количествах. Она помогает им быстро закрепиться в популяции, а также в клетках и тканях индивидуального хозяина — животного или растения. Но, после того как вирус закрепился в организме хозяина, продолжающееся повреждение тканей, ведущее к ослаблению и гибели хозяина, становит-

ся крайне неблагоприятным. Одним из механизмов регуляции избыточного количества вируса служит образование дефектных геномов, которые обычно лучше всего накапливаются при достижении высоких местных концентраций вируса; с его помощью ослабляется летальное действие вируса на клетки, происходит взаимодействие с генетическим материалом выживающих клеток и организмов, а также эволюционные изменения вируса и хозяина.

Литература

1. Ahmed R., Fields B. N. (1981). Reassortment of genome segments between reovirus defective interfering particles and infectious virus: Construction of temperature-sensitive and attenuated virus by rescue of mutations from DI particles, *Virology*, **111**, 351—363.
2. Ahmed R., Fields B. N. (1982). Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L cells, *Cell*, **28**, 605—612.
3. Ahmed R., Graham A. F. (1977). Persistent infection in L cells with temperature-sensitive mutants of reovirus, *J. Virol.*, **23**, 250—262.
4. Ahmed R., Canning W. M., Kauffman R. S., Sharpe A. H., Hallum J. V., Fields B. N. (1981). Role of the host cell in persistent viral infection: Coevolution of L cells and reovirus during persistent infection, *Cell*, **25**, 325—332.
5. Altenbach S. B., Howell S. H. (1981). Identification of a satellite RNA associated with turnip crinkle virus, *Virology*, **112**, 25—33.
6. Atabekov J. G. (1977). Defective and satellite plant viruses. In: Comprehensive Virology, Vol. II, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 143—193, Plenum Press, New York.
7. Banerjee A. K. (1980). The in vitro mRNA transcription process. In: Rhabdoviruses, Vol. 2, ed. by D. H. L. Bishop, pp. 35—50, CRC Press, Boca Raton, FL.
8. Banerjee A. K., Abraham G., Colonno R. J. (1977). Vesicular stomatitis virus: Mode of transcription, *J. Gen. Virol.*, **34**, 1—8.
9. Barksdale L., Arden S. B. (1976). Persisting bacteriophage infection, lysogeny and phage conversion, *Annu. Rev. Microbiol.*, **28**, 265—299.
10. Barrett A. D. T., Frouch C. F., Dimmock N. J. (1981). Assay of defective-interfering Semliki Forest virus by the inhibition of synthesis of virus-specified RNAs, *J. Gen. Virol.*, **54**, 273—280.
11. Barrett K., Barclay S., Calendar R., Lindqvist B., Six E. (1974). Reciprocal transactivation in a two chromosome phage system. In: Mechanisms of Virus Disease, ed. by W. S. Robinson and C. F. Fox, pp. 385—391, W. A. Benjamin, Menlo Park, CA.
12. Bay P. H. S., Reichmann M. E. (1979). UV inactivation of the biological activity of defective interfering particles generated by vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, **32**, 876—884.
13. Bay P., Reichmann M. (1982). In vitro inhibition of primary transcription of vesicular stomatitis virus by a defective interfering particle, *J. Virol.*, **41**, 172—182.
14. Bellet A. J. D., Cooper P. D. (1959). Some properties of the transmissible interfering component of VSV preparations, *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 498—509.
15. Bishop J. M. (1981). Enemies within: The genesis of retrovirus oncogenes, *Cell*, **23**, 5—16.
16. Blumberg B. M., Kolakofsky D. (1981). Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures, *J. Virol.*, **40**, 568—576.

17. *Blumberg B. M., Leppert M., Kolakofsky D.* (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication, *Cell*, **23**, 831—845.
18. *Bonino F., Hoyer B., Ford E., Shih J. W., Purcell R. H., Gerin J. L.* (1981). The δ agent: HbsAg particles with δ antigen and RNA in the serum of an HBV carrier, *Hepatology*, **1**, 127—131.
19. *Botstein D.* (1981). A modular theory of virus evolution. In: *Animal Virus Genetics*, ed. by B. N. Fields, R. Jaenisch and C. F. Fox, pp. 11—20, Academic Press, New York.
20. *Botstein D., Susskind M. M.* (1974). Regulation of lysogeny and the evolution of temperate bacterial viruses. In: *Mechanisms of Viral Disease*, ed. by W. S. Robinson and C. F. Fox, pp. 363—384, W. A. Benjamin, Menlo Park, CA.
21. *Bradley D. E.* (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins, *Bacteriol. Rev.*, **31**, 230—314.
22. *Brockman W. W.* (1977). Evolutionary variants of simian virus 40, *Prog. Med. Virol.*, **23**, 69—95.
23. *Brockman W. W., Lee T. N. H., Nathans D.* (1973). The evolution of new species of viral DNA during serial passage of simian virus 40 at high multiplicity, *Virology*, **54**, 384—397.
24. *Chanda P. K., Chambers T. M., Nayak D. P.* (1983). In vitro transcription of DI particles of influenza virus produces polyadenylic acid-containing complementary RNAs, *J. Virol.*, **45**, 55—61.
25. *Choppin P. W.* (1969). Replication of influenza virus in a continuous cell line: High yield of infectious virus from cells inoculated at high multiplicity, *Virology*, **39**, 130—134.
26. *Cole C. N.* (1975). Defective interfering (DI) particles of poliovirus, *Prog. Med. Virol.*, **20**, 180—207.
27. *Cole C. N., Baltimore D.* (1973). Defective interfering particles of poliovirus. III. Interference and enrichment, *J. Mol. Biol.*, **76**, 345—361.
28. *Cole C. N., Baltimore D.* (1973). Defective interfering particles of polioviruses. IV. Mechanisms of enrichment, *J. Virol.*, **12**, 1414—1426.
29. *Cole C. N., Smoler D., Wimmer E., Baltimore D.* (1971). Defective interfering particles of poliovirus. I. Isolation and physical properties, *J. Virol.*, **7**, 478—485.
30. *Colonna R. J., Banerjee A. K.* (1978). Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus, *Cell*, **15**, 93—101.
31. *Cooper P. D.* (1977). Genetics of picornaviruses, *Compr. Virol.*, **9**, 133—207.
32. *Cooper P. D., Bellet A. J. D.* (1959). A transmissible interfering complement of vesicular stomatitis virus preparation, *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 485—497.
33. *Crick J., Cartwright B., Brown F.* (1966). Interfering components of vesicular stomatitis virus, *Nature (Lond.)*, **211**, 1204—1205.
34. *Crompton W. M., Clewley J. P., Dimmock N. J., Avery R. J.* (1979). Origin of subgenomic RNAs in defective-interfering influenza virus, *FEMS, Microbiol. Lett.*, **6**, 431—434.
35. *Dauenhauer S. A., Robinson R. A., O'Callahan D. J.* (1982). Chronic production of defective interfering particles by hamster embryo cultures of herpesvirus persistently infected and oncogenically transformed cells, *J. Gen. Virol.*, **60**, 1—14.
36. *Davis N. L., Wertz G. W.* (1982). Synthesis of vesicular stomatitis virus negative-strand RNA in vitro: Dependence on viral protein synthesis, *J. Virol.*, **41**, 821—832.
37. *De B. K., Perrault J.* (1982). Signal sequence involved in the generation of an internal deletion DI RNA for VSV, *Nucleic Acids Res.*, (Lond.), **10**, 6919—6930.

38. *de la Maza L. M., Carter B. J.* (1980). Molecular structure of adenoassociated virus variant DNA, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3194—3203.
39. *Deuring R., Klotz G., Doerfler W.* (1981). An unusual symmetric recombinant between adenovirus type 12 DNA and human cell DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3142—3146.
40. *Dohner D., Monroe S., Weiss B., Schlesinger S.* (1979). Oligonucleotide mapping studies of standard and defective Sindbis virus RNA, *J. Virol.*, **29**, 794—798.
41. *Domingo E., Sabo D., Taniguchi T., Weissman C.*, (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population, *Cell*, **13**, 735—744.
42. *Enea V., Zinder N. D.* (1982). Interference resistant mutants of phage $\phi 1$, *Virology*, **122**, 222—226.
43. *Epstein D. A., Herman R. C., Chien I., Lazzarini R. A.* (1980). Defective interfering particle generated by internal deletion of the vesicular stomatitis virus genome, *J. Virol.*, **33**, 818—829.
44. *Fareed G. C., Davoli D.* (1977). Molecular biology of papovaviruses, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 471—522.
45. *Faust E. A., Ward D. C.* (1979). Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: Selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication, *J. Virol.*, **32**, 276—292.
46. *Fields S., Winter G.* (1982). Nucleotide sequences of influenza virus segments 1 and 3 reveal mosaic structure of a small viral RNA segment, *Cell*, **28**, 303—313.
47. *Fraenkel-Conrat H., Williams R. C.* (1955). Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**, 690—698.
48. *Frenkel N.* (1981). Defective interfering herpesviruses. In: *The Human Herpesviruses. — An Interdisciplinary Prospective*, ed. by A. J. Nahmias, W. R. Dowdle, and R. S. Schinazy, pp. 91—120, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
49. *Fried M., Griffen B. E.* (1977). Organization of the genomes of polyoma virus and SV₄₀. *Adv. Cancer Res.*, **24**, 67—113.
50. *Fukada M., Okada Y.* (1982). Mechanisms of tobacco mosaic virus assembly: Role of subunit and larger aggregate protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5833—5836.
51. *Guild G. M., Stollar V.* (1977). Defective interfering particles of Sindbis virus. V. Sequence relationship between SV_{STD} 42S RNA and intracellular defective viral RNAs, *Virology*, **77**, 175—188.
52. *Gutai M. W., Nathans D.* (1978). Evolutionary variants of SV₄₀: Nucleotide sequence of a conserved SV₄₀ DNA segment containing the origin of viral DNA replication as an inverted repetition, *J. Mol. Biol.*, **126**, 259—274.
53. *Hackertt A. J.* (1964). A possible morphological basis for the autointerference phenomenon in vesicular stomatitis virus, *Virology*, **24**, 51—59.
54. *Hackertt A. J., Schaffer F. L., Madin S. H.* (1967). The separation of infectious and autointerfering particles in vesicular stomatitis virus preparation, *Virology*, **31**, 114—119.
55. *Henle W., Henle G.* (1943). Interference of active virus with the propagation of virus of influenza, *Science*, **98**, 87—89.
56. *Henry B. E., Newcomb W. W., O'Callaghan D. J.* (1979). Biological and biochemical properties of defective interfering particles of equine herpesvirus type 1, *Virology*, **92**, 495—506.
57. *Hill V. M., Summers D. F.* (1982). Synthesis of VSV RNAs in vitro by cellular extracts: VSV protein requirements for replication in vitro, *Virology*, **123**, 407—419.
58. *Hill V. M., Marnell L., Summers D. F.* (1981). In vitro replication and assembly of vesicular stomatitis virus nucleocapsids, *Virology*, **113**, 109—118.
59. *Holland J. J., Villarreal L. P.* (1975). Purification of defective interfering

- T particles of vesicular stomatitis and rabies viruses generated in vivo in brains of newborn mice, *Virology*, **67**, 438—449.
60. Holland J. J., Villarreal L. P., Breindl M. (1976). Factors involved in the generation and replication of rhabdovirus defective T particles, *J. Virol.*, **17**, 805—815.
 61. Holland J. J., Kennedy S. I. T., Semler B. L., Jones C. L., Roux L., Grabau E. A. (1980). Defective interfering RNA viruses and the host cell response. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 16, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 137—192, Plenum Press, New York.
 62. Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., Vande-Pol S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes, *Science*, **215**, 1577—1585.
 63. Horodyski F. M., Holland J. J. (1980). Viruses isolated from cells persistently infected with vesicular stomatitis virus show altered interactions with defective interfering particles, *J. Virol.*, **36**, 627—631.
 64. Horodyski F. M., Holland J. J. (1981). Continuing evolution of virus-DI particle interaction resulting during VSV persistent infection. In: *Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. Compans, pp. 887—892, Elsevier, Amsterdam.
 65. Horodyski F., Holland J. (1983). Properties of DI particle-resistant mutants of vesicular stomatitis virus isolated from persistent infection and from undiluted passages, *Cell*, **33**, 801—810.
 66. O'Hara P. J., Horodyski F. M., Nichol S. T., Holland J. J. (1984). Vesicular stomatitis virus mutants resistant to defective interfering particles accumulate stable 5'-terminal and fewer 3'-terminal mutations in a stepwise manner, *J. Virol.*, **49**, 793—798.
 67. Huang A. S. (1977). Viral pathogenesis and molecular biology, *Bacteriol. Rev.*, **41**, 811—821.
 68. Huang A. S., Baltimore D. (1970). Defective viral particles and viral disease processes, *Nature*, **226**, 325—327.
 69. Huang A. S., Baltimore D. (1977). Defective interfering animal viruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 10, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 73—106, Plenum Press, New York.
 70. Huang A. S., Manders E. K. (1972). Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. IV. Transcription by standard virus in the presence of defective interfering particles, *J. Virol.*, **9**, 909—916.
 71. Huang A. S., Wagner R. R. (1966). Comparative sedimentation coefficients of RNA extracted from plaqueforming and defective particles of vesicular stomatitis virus, *J. Mol. Biol.*, **22**, 381—384.
 72. Huang A. S., Greenwalt J. W., Wagner R. R. (1966). Defective T particles of vesicular stomatitis virus. I. Preparation, morphology, and some biologic properties, *Virology*, **30**, 161—172.
 73. Issac C. L., Keene J. D. (1982). RNA polymerase-associated interactions near template-promoter sequences of defective interfering particles of VSV, *J. Virol.*, **43**, 241—249.
 74. Jacobsen S., Pfau C. J. (1980). Viral pathogenesis and resistance to defective interfering particles, *Nature (Lond.)*, **283**, 311—313.
 75. Jacobsen S., Schlesinger S. (1981). Defective interfering particles of Sindbis virus do not interfere with the homologous virus obtained from persistently infected cells but do interfere with Semliki Forest virus, *J. Virol.*, **37**, 840—844.
 76. Jochemsen H., Daniels G., Hertoghs J., Schrier P., Van den Elsen P., Van der Eb A. J. (1982). Identification of adenoviruses—Type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis, *Virology*, **122**, 15—28.
 77. Johnson A. D., Barkan A., Mertz J. E. (1982). Nucleotide sequence analysis of the recombination joints in 16 naturally-arising deletion mutants of SV₄₀, *Virology*, **123**, 464—469.
 78. Johnson A. D., Poteete A. R., Lauer G., Sauer R. T., Ackers G. K., Ptash-

- ne M. (1981). α Repressor and cro-components of an efficient molecular switch, *Nature* (Lond.), **294**, 217—223.
79. Kääriäinen L., Petterson R. F., Keränen S., Lehtovaara P., Söderlung H., Ukkonen P. (1981). Multiple structurally related defective-interfering RNAs formed during indiluted passages of Semliki Forest virus, *Virology*, **113**, 686—697.
 80. Kailash G. G., Gupta K. C., Kingsbury D. W. (1983). Genomic and copyback 3' termini in Sendai virus defective interfering RNA species, *J. Virol.*, **45**, 659—664.
 81. Kawai A., Matsumoto S. (1977). Interfering and noninterfering defective particles generated by a rabies small plaque variant virus, *Virology*, **76**, 60—71.
 82. Kawai A., Matsumoto S. (1982). A sensitive bioassay for detecting defective interfering particles of rabies virus, *Virology*, **122**, 98—108.
 83. Keene J. D., Chien I. M., Lazzarini R. A. (1981). Vesicular stomatitis defective interfering particle containing a muted, internal leader RNA gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **18**, 2090—2094.
 84. Keene J. D., Schubert M., Lazzarini R. A., Rosenberg M. (1978). Nucleotide sequence homology at the 3' termini of RNA from VSV and its defective interfering particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3225—3229.
 85. Keene J. D., Schubert M., Lazzarini R. A. (1980). Intervening sequence between the leader region and the nucleocapsid gene of VSV RNA, *J. Virol.*, **33**, 789—794.
 86. Kennedy S. I. T., Bruton C. J., Weiss B., Schlesinger S. (1976). Defective-interfering passages of Sindbis virus: Nature of the defective virion RNA, *J. Virol.*, **19**, 1034—1043.
 87. King A. M. Q., McCahon D., Slade W. R., Newman J. W. I. (1982). Recombination in RNA, *Cell*, **29**, 921—928.
 88. Kingsbury D. W., Portner A. (1980). On the genesis of incomplete Sendai virions, *Virology*, **42**, 872—879.
 89. Kingsbury D. W., Portner A., Darlington R. W. (1970). Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic viral RNAs, *Virology*, **42**, 857—871.
 90. Kolakofsky D. (1976). Isolation and characterization of Sendai virus DI-RNAs, *Cell*, **8**, 547—555.
 91. Kolakofsky D. (1979). Studies on the generation and amplification of Sendai virus defective-interfering genomes, *Virology*, **93**, 589—593.
 92. Koschka-Dierich C., Wermer F. J., Bauer I., Fleckenstein B. (1982). Structure of non-integrated, circular *Herpesvirus saimiri*, and *Herpesvirus ateles* genomes in tumor cell lines in vitro transformed cells, *J. Virol.*, **44**, 295—310.
 93. Kowal K., Stollar V., Dubin D. T. (1980). The 5'-terminal sequences of Sindbis virus defective RNA (Abstr.), *Am. Soc. Microbiol.*, 240.
 94. Krug R. M., Bouloy M., Plotch S. J. (1981). The 5' ends of influenza viral messenger RNAs are donated by capped cellular RNAs, *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 7—10.
 95. Ladin B. F., Blankenship M. L., Ben-Porat T. (1980). Replication of herpesvirus DNA. V. Maturation of concatameric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation, *J. Virol.*, **33**, 1151—1163.
 96. Larsen S. H. (1982). Evolutionary variants of mouse adenovirus containing cellular DNA sequence, *Virology*, **116**, 573—580.
 97. Lazzarini R. A., Keene J. D., Schubert M. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses, *Cell*, **26**, 145—154.
 98. Lazzarini R. A., Weber G. H., Johnson L. D., Stamminger G. M. (1975). Covalently linked message and antimessage (genomic) RNA from a defective vesicular stomatitis virus particle, *J. Mol. Biol.*, **97**, 289—308.
 99. Leamson R. N., Reichmann M. E. (1974). The RNA of defective vesicular-stomatitis virus particles in relation to viral cistrons, *J. Mol. Biol.*, **85**, 551—568.

100. Lee T., Nathans D. (1979). Evolutionary variants of SV₄₀: Replication and encapsidation of variant DNA, *Virology*, **92**, 291—298.
101. Lehtovaara P., Söderlund H., Keränen S., Pettersson R., Kääriäinen L. (1981). 18S defective interfering RNA of Semliki Forest virus contains a triplicated repeat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5353—5357.
102. Leppert M., Kort L., Kolakofsky D. (1977). Further characterization of Sendai virus DI-RNAs: A model for their generation, *Cell*, **12**, 539—552.
103. Leppert M., Rittenhouse L., Perrault J., Summers D. F., Kolakofsky D. (1979). Plus and minus strand leader RNAs in negative-strand virus-infected cells, *Cell*, **18**, 735—748.
104. Lotz W. (1976). Defective bacteriophages: The phage tail-like particles, *Prog. Mol. Subcell Biol.*, **4**, 53—102.
105. Lundquist R. E., Sullivan M., Maizel J. V. (1979). Characterization of a new isolate of poliovirus defective interfering particles, *Cell*, **18**, 759—769.
106. Lwoff A. (1953). Lysogeny, *Bacteriol. Rev.*, **17**, 269—337.
107. Macdonald R. D., Yamamoto T. (1978). Quantitative analysis of defective interfering particles in infectious pancreatic necrosis virus preparations, *Arch. Virol.*, **57**, 77—89.
108. McClure M. A., Holland J. J., Perrault J. (1980). Generation of defective interfering particles in picornaviruses, *Virology*, **100**, 408—418.
109. McGeoch D. J., Dolan A. (1979). Sequences of 200 nucleotides at the 3' terminus of the genome RNA of vesicular stomatitis virus, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4007—4024.
110. Mocarski E. S., Roizman B. (1982). Herpesvirus dependent amplification and inversion of cell-associated viral thymidine kinase gene flanked by viral *a* sequences and linked to an origin of viral DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5626—5630.
- 110a. Monroe S. S., Schlesinger S. (1983). RNAs from two independently isolated defective interfering particles of Sindbis virus contain cellular tRNA sequence at their 5' ends, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3279—3283.
111. Nayak D. P. (1980). Defective interfering influenza viruses, *Annu. Rev. Microbiol.*, **34**, 619—644.
112. Nayak D. P., Sivasubramanian N., Davis A. R., Cortini R., Sung J. (1982). Complete sequence analyses show that two defective interfering influenza virus RNAs contain a single internal deletion of a polymerase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2216—2220.
113. Neel B., Hayward W., Robinson H., Fang J., Astrin S. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: Oncogenesis by promoter insertion, *Cell*, **23**, 323—334.
114. Nichol T., Penn C. R., Mahy B. W. J. (1981). Evidence for the involvement of influenza A (fowl plague Rostock) virus protein P2 in ApG and mRNA primed in vitro RNA synthesis, *J. Gen. Virol.*, **57**, 407—413.
115. Nomoto A., Jacobsen A., Lee Y. F., Dunn J., Wimmer E. (1979). Defective interfering particles of poliovirus: Mapping of the deletion and evidence that the deletions in the genomes of DI (1), (2), and (3) are located in the same region, *J. Mol. Biol.*, **128**, 179—196.
116. Nonoyama M., Graham A. F. (1970). Appearance of defective virions in clones of reovirus, *J. Virol.*, **6**, 693—694.
117. Norkin L. C., Tirrell S. M. (1982). Emergence of simian virus 40 variants during serial passage of plaque isolates, *J. Virol.*, **42**, 730—733.
- 117a. O'Hara P. J., Nichol S. T., Horodyski F. M., Holland J. J. (1984). Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain genomic sequence rearrangements and base substitutions, *Cell*, **36**, 915—924.
118. O'Neill F. J., Maryon E. B., Carrol D. (1982). Isolation and characterization of defective SV₄₀ genomes which complement for infectivity, *J. Virol.*, **43**, 18—25.

119. Overton H. A., Buck K. W., Bailey L., Ball B. V. (1982). Relationships between the RNA components of chronic bee-paralysis virus and those of chronic bee-paralysis virus associate, *J. Gen. Virol.*, **63**, 171—179.
120. Papamatheakis J., Lee T., Thayer R. E., Singer M. F. (1981). Recurring defective variants of SV₄₀ containing monkey DNA segments, *J. Virol.*, **37**, 295—306.
121. Payne G., Courtneidge S., Crittenden L., Fadly A., Bishop J., Varmus H. (1981). Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: Viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state, *Cell*, **23**, 311—322.
122. Perrault J. (1976). Cross-linked double stranded RNA from a defective vesicular stomatitis virus particle, *Virology*, **70**, 360—371.
123. Perrault J. (1981). Origin and replication of defective interfering particles, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **93**, 151—207.
124. Perrault J., Holland J. J. (1972). Variability of vesicular stomatitis virus autointerference with different host cells and virus serotypes, *Virology*, **50**, 148—158.
125. Perrault J., Holland J. J. (1972). Absence of transcriptase activity and transcription-inhibiting ability in defective interfering particles of vesicular stomatitis virus, *Virology*, **50**, 159—170.
126. Perrault J., Semler B. L. (1979). Internal genome deletions in two distinct classes of defective interfering particles of vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6191—6195.
127. Pettersson R. (1981). 5'-terminal nucleotide sequence of Semliki Forest virus 18S defective interfering RNA is heterogeneous and different from the genomic 42S RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 115—119.
128. Piazzolla P., Tousignant M. E., Kaper J. M. (1982). Cucumber mosaic virus-associated RNAs. IX. The overtaking of viral RNA synthesis by CARNA 5 and ds CARNA 5 in tobacco, *Virology*, **122**, 147—157.
129. Popescu M., Lehmann-Grube F. (1977). Defective interfering particles in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus, *Virology*, **77**, 78—83.
130. Popescu M., Schaefer H., Lehmann-Grube F. (1976). Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus: Detection and measurement of interference foci-forming units, *J. Virol.*, **20**, 1—8.
131. Reichmann M. E. (1964). The satellite tobacco necrosis virus: A single protein and its genetic code, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1009—1011.
132. Reichmann M. E., Schnitzlein W. M. (1979). Defective interfering particles of rhabdoviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **86**, 123—168.
133. Rowlands D. J. (1979). Sequences of VSV RNA in the region coding for the leader RNA, N protein mRNA, and their junction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4793—4797.
134. Ruiz-Opazo N., Chakraborty P. R., Shafritz D. A. (1982). Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: Possible implications in persistent HBV infection, *Cell*, **29**, 129—138.
135. Samulski R. J., Berns K. I., Tan M., Muzyczka N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: Rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2077—2081.
136. Schubert M., Keene J. D., Lazzarini R. A. (1979). A specific internal RNA polymerase recognition site of VSV RNA is involved in the generation of DI particles, *Cell*, **18**, 749—757.
137. Schuerch A. R., Matsuhisa T., Joklik W. K. (1974). Temperature-sensitive mutants of reovirus. VI. Mutant ts447 and ts556 particles that lack either one or two genome segments, *Intervirology*, **3**, 36—46.
138. Sekellick M. J., Marcus P. I. (1980). Viral interference by defective particles of vesicular stomatitis virus measured in individual cells, *Virology*, **104**, 247—252.

139. Semler B. L., Perrault J., Holland J. J. (1979). The nucleotide sequence of the 5' terminus of VSV RNA, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3923—3931.
140. Semler B. L., Perrault J., Abelson J., Holland J. J. (1978). Sequence of a RNA templated by the 3'-OH terminus of defective interfering particles of vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4704—4708.
141. Shubert M., Keene J. D., Lazzarini R. A., Emerson S. U. (1978). The complete sequence of a unique RNA species synthesized by a DI particle of VSV, *Cell*, **15**, 103—112.
142. Simonsen C. C., Hill V. M., Summers D. F. (1979). Further characterization of vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, **31**, 497—505.
143. Spaete R. R., Frenkel N. (1982). The herpes simplex virus amplicon: A new eukaryotic defective-virus cloning-amplifying vector, *Cell*, **30**, 295—304.
144. Spandidos D. A., Graham A. F. (1976). Generation of defective virus after infection of newborn rats with reovirus, *J. Virol.*, **20**, 234—247.
145. Srivastava A., Lusby E. W., Berns K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome, *J. Virol.*, **45**, 555—564.
146. Stampfer M., Baltimore D., Huang A. S. (1969). Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. I. Species of ribonucleic acid found in Chinese hamster ovary cells infected with plaque-forming and defective particles, *J. Virol.*, **4**, 154—161.
147. Stevens J., Todaro G., Fox C., eds. (1978). *Persistent Viruses*, Academic Press, New York.
148. Stinski M. F., Mocarski E. S., Thomsen D. R. (1979). DNA of human cytomegalovirus: Size heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage, *J. Virol.*, **31**, 231—239.
149. Stollar V. (1980). Defective interfering alphaviruses. In: *The Togaviruses, Biology, Structure, Replication*, ed. by R. W. Schlesinger, pp. 427—455, Academic Press, New York.
150. Vlazny D. A., Frenkel N. (1981). Replication of herpes simplex virus DNA: Localization of replication recognition signals within defective virus genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 742—746.
151. Vlazny D. A., Kwong A., Frenkel N. (1982). Site specific cleavage/packaging of herpes virus DNA and the selective maturation of nucleocapsids containing full length viral DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1423—1427.
152. von Magnus P. (1954). Incomplete forms of influenza virus, *Adv. Virus Res.*, **2**, 59—79.
153. Weinberg R. A. (1982). Fewer and fewer oncogenes, *Cell*, **30**, 3—4.
154. Weiss B., Goran D., Cancedda R., Schlesinger S. (1974). Defective-interfering passages of Sindbis virus: Nature of the intracellular defective viral RNA, *J. Virol.*, **14**, 1189—1198.
155. Welsh R. M., O'Connell C. M., Pfau C. J. (1972). Properties of defective lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Gen. Virol.*, **17**, 355—359.
156. Winship T. R., Thacore H. R. (1980). A sensitive method of quantification of vesicular stomatitis virus defective interfering particles. Focus forming assay, *J. Gen. Virol.*, **48**, 237—240.
157. Yang F., Lazzarini R. A. (1983). Analysis of the recombination event generating a vesicular stomatitis virus deletion defective interfering particle, *J. Virol.*, **45**, 766—772.
158. Yogo Y., Furuno A., Watanabe S., Yoshuki K. (1980). Occurrence of free defective viral DNA in hamster tumor induced by human papovavirus BK, *Virology*, **103**, 241—244.
159. Younger J. S., Preble O. T. (1980). Viral persistence: Evolution of viral populations, *Compr. Virol.*, **16**, 73—135.
160. Zimmer D. (1977). The nucleotide sequence at the origin for assembly of tobacco mosaic virus RNA, *Cell*, **11**, 463—482.

Основы генетики вирусов животных

Роберт Ф. Рэмиг¹

Конечная цель генетического изучения вирусов животных — понимание деталей структуры и функции вирусного генома и каждого из генных продуктов вируса. На раннем этапе исследования генетики вирусов животных в основном заключались в сборе и последующей генетической и физиологической характеристизации вирусных мутантов. В последнее время вирусные мутанты стали использовать в качестве специфических инструментов для исследования генетических и биохимических событий, происходящих в зараженной клетке. Работы такого рода с вирусами животных в целом запаздывали по сравнению с аналогичными работами на прокариотических системах. За последние несколько лет наблюдался взрывообразный рост числа опубликованных сообщений по различным аспектам генетики эукариотических систем вообще, и системы клетка — вирус животных в частности.

Цель настоящей главы — описание фундаментальных явлений, наблюдаемых в различных системах вирус — клетка. Изложение будет построено таким образом, что вначале будет описано явление в общем, а затем приведены один или два примера, иллюстрирующие это явление в какой-то конкретной системе вирус — клетка. Там, где это возможно, примеры будут приводиться как для ДНК-содержащих, так и для РНК-содержащих вирусов. Из-за недостатка места рассмотрение каждой системы не может быть исчерпывающим. Однако по многим вирусам существуют специальные обзоры, куда мы и отсылаем читателя за подробностями, которые мы вынуждены здесь опустить. Ниже приводится список (неполный) обзоров, посвященных системам, рассматриваемым в этой главе и включающим следующие вирусы: обезьяний вирус SV40 и вирус полиомы [34, 73, 148]; аденовирусы [48, 49] и гибриды адено-SV40 [102], герпесвирусы [121, 122, 127, 141]; пикорнавирусы [20]; тогавирусы [103]; рабдовирусы [104, 105]; ретровирусы [87, 159]; реовирусы [39, 111]; виру-

¹ Robert F. Ramig, Department of Virology and Epidemiology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, Texas 77030.

сы гриппа [129, 164]; буньявирусы [6] и парамиксовирусы [9]. Существуют также обзоры, посвященные некоторым конкретным генетическим явлениям: мутациям [28, 29, 61, 123]; реверсии и супрессии [55, 108], комплементации [42]; рекомбинации [30, 43, 107] и интерференции [60, 65].

Генетическая методология

На раннем этапе генетические исследования вирусов животных сдерживались из-за отсутствия подходящих методов исследования индивидуального потомства при смешанном заражении. Решение этой проблемы было найдено Дульбекко [32, 33], который разработал метод бляшек для цитопатических вирусов. Использование метода бляшек позволило точно определять количество потомства, получать чистые клональные штаммы вируса и очищать вирусы от других примесных вирусов и дефектных интерферирующих частиц того же типа вируса. С помощью этого метода была получена система, пригодная для анализа условно-летальных мутаций. Таким образом, в значительной степени генетика вирусов животных началась с введения в практику метода бляшек. В настоящее время применимость метода бляшек рассматривают как необходимое условие для начала исследований генетики новой группы вирусов подобно тому, как разработка метода фокусов трансформации для нецитолитических, трансформирующих вирусов [151] послужила ключом к развитию генетических исследований этих вирусов.

Для исследования генетики некоторых групп вирусов имела значение разработка и других методов и приемов. Например, для построения физической карты генов вируса полиомиелита и других энтеровирусов было существенным использование ингибитора пактамицина [118]. При изучении регуляции синтеза вирусных нуклеиновых кислот и белков во многих системах, например у герпесвирусов, с успехом использовали ингибиторы белкового синтеза, такие как пуромицин или циклогексимид, а также ингибиторы синтеза РНК, например актиномицин D [62]. Разработка электрофоретических систем с высоким разрешением для анализа белков и нуклеиновых кислот позволила провести генетические исследования вирусов с сегментированным РНК-геномом, используя в качестве маркеров полиморфизм электрофоретической подвижности РНК-сегментов и белков [99, 113]. Применение рестрикционных эндонуклеаз сыграло аналогичную роль для ДНК-содержащих вирусов с использованием в качестве генетических маркеров полиморфизма подвижности фрагментов ДНК и белков [53, 81, 95]. Методы исследования транскрипции и трансляции *in vitro* вирусов доказали свою эффективность при построении физических карт, особенно в систе-

мах, где отсутствует генетическая рекомбинация [4, 45, 91]. В последнее время генетические приемы используют для изучения вирусного патогенеза и иммунного ответа хозяина на вирусную инфекцию, если хотя бы сопоставить специфические свойства вируса с индивидуальными вирусными генами и генными продуктами [41, 131]. Иными словами, современный генетик, изучающий вирусы животных, охотно заимствует методы у биохимика и применяет их в генетическом анализе. Наряду с этим генетики и другие специалисты используют генетический анализ для ответа на вопросы, которым традиционно не уделялось должного внимания. Такое слияние дисциплин очень помогло генетикам и в значительной мере определило быстрый прогресс этой науки в последние несколько лет.

Мутации

Термины «штамм», «тип», «вариант» и «мутант» используют очень широко и без особого разграничения. В общем каждый из них означает вирус, который отличается каким-то наследуемым образом от родительского «дикого» вируса. Термин «дикий тип» первоначально получил распространение среди селекционеров домашних растений и животных и используется для обозначения исходных типов растений и животных. Он приобрел более узкое значение у молекулярных генетиков, которые используют его для обозначения исходного, обычно адаптированного к лабораторным условиям штамма вируса, из которого отбирают мутанты и с которым их сравнивают. Таким образом, дикий тип — это условное обозначение, которое связывают с определенной популяцией и обычно применяют к ней только в связи с какой-то определенной исследуемой мутацией, например температурочувствительной (*ts*). Однако дикий тип, или *ts*⁺-вирус, может содержать иные мутации (не *ts*-класса, по отношению к которым дикий тип был определен). Теперь общепризнано, что вирус или ген, обозначаемый как дикий, может не совсем точно соответствовать вирусу или гену, выделенному из природной популяции. Это обстоятельство заставляет различать лабораторные дикие типы и новые вирусные изоляты, полученные от природных хозяев и обозначаемые как «природные изоляты». С терминами «штамм», «тип» и «вариант» связывают свои специфические значения. Штаммом часто обозначают различные дикие типы одного вируса, например штаммы Орсэи и Нью-Джерси вируса везикулярного стоматита. Термин «тип» стал синонимом термина «серотип», который определяют по нейтрализации инфекционности, например серотипы реовируса 1, 2 и 3. Термин «вариант» обычно обозначает вирус, который фенотипически отличается от дикого типа, но вместе с тем генотипическая основа различия для него

неизвестна, например варианты по нейтрализации сыворотками. В большинстве современных генетических вирусологических исследований обычно имеют дело с мутантами, которые отличаются от дикого типа по известным генетическим параметрам; в связи с этим другие термины встречаются не часто.

Спонтанная мутация

Некоторые вирусы дают значительную долю мутантов при пассировании в отсутствие каких-либо известных мутагенов. Эти спонтанные мутации накапливаются в геномах вирусов и приводят к изменчивости фенотипа, которая является объектом селективного давления в ходе эволюции вируса. Скорости спонтанного мутагенеза в ДНК-геномах низки; они составляют 10^{-8} — 10^{-11} на каждый включенный нуклеотид. У РНК-содержащих вирусов скорости спонтанного мутагенеза значительно выше, порядка 10^{-3} — 10^{-4} на каждый включенный нуклеотид. Считают, что более высокие скорости накопления мутаций обусловлены низкой точностью репликации РНК-геномов, вероятно связанной с отсутствием у РНК-репликаз корректирующей активности, которая присуща ферментам, реплицирующим ДНК [61]. Таким образом, в то время как геномы ДНК-содержащих вирусов относительно стабильны, этого нельзя сказать об РНК-содержащих вирусах, т. е. высокие скорости спонтанного мутагенеза делают концепцию дикого типа применительно к ним довольно шаткой. Тем не менее данные, полученные на системе фага Q β , показали, что в равновесии дикий тип доминирует в популяции, поскольку он реплицируется быстрее, чем спонтанно возникающие мутанты [27]. К сожалению для генетиков, ряд факторов стимулирует неравновесие в популяции геномов [61], и эти факторы часто способствуют накоплению мутантов в популяции. Из-за спонтанного мутагенеза трудно поддерживать гомогенность популяции вируса, будь то дикий тип или мутант. Для того чтобы обойти эту трудность, вирусы периодически реклонировать, однако мутанты часто возникают и в ходе образования бляшки, и в ходе роста вируса, поэтому бывает трудно получить генетически однородные препараты вируса с высоким титром [13, 163].

Как отмечалось выше, скорость спонтанного мутагенеза особенно высока в РНК-геномах. Например, популяции вируса Ньюкаслской болезни содержат мелкобляшечные мутанты с частотой от 3 до 7% [52]. Для вируса везикулярного стоматита частота перехода к *ts*-фенотипу равна 1—5% [105]. Напротив, для ДНК-содержащих вирусов частота спонтанного мутагенеза значительно ниже. Для вируса оспы кроликов обнаружено менее 0,1% спонтанных *ts*-мутантов [124]. В большинстве случаев скорость спонтанного мутагенеза настолько низка, что не заслужи-

вает специального обсуждения. Лишь в нескольких случаях скорость спонтанного мутагенеза у ДНК-содержащих вирусов составляла до 1% [36].

Индукцированные мутации

Большая часть мутантов, выделенных в ходе исследования вирусов животных, получена из популяций дикого типа, обработанных мутагенами. Мутагены обычно применяют для того, чтобы увеличить частоту мутаций в популяции, после чего мутанты подвергают скринингу с помощью подходящего селективного давления. Основной проблемой, связанной с использованием мутагенов, является подбор подходящей дозы, так чтобы частота мутаций с требуемым фенотипом увеличивалась, но вероятность множественных мутаций в индивидуальном геноме была минимальна. Поскольку применение большинства мутагенов приводит к потере инфекционности или к снижению урожая вируса, для каждой комбинации вирус — клетка — мутаген следует получать кривую зависимости действия от дозы мутагена. Из такой кривой можно рассчитать число летальных «ударов» в среднем на геном, пользуясь распределением Пуассона. Однако, поскольку многие мутации не являются летальными, число летальных ударов при данной дозе мутагена оказывается абсолютно минимальным числом мутационных событий, индуцированных мутагеном при этой дозе. Как правило, желательно получить мутанты, которые отличаются от дикого типа только одной мутацией. Для того чтобы сделать максимальной вероятность выделения мутантов, содержащих только одну мутацию, отбор ведут при наиболее низкой дозе мутагена, дающей достаточную частоту мутаций с желаемым фенотипом.

В системах с вирусами животных было использовано множество различных мутагенов, но все они входят в небольшое число классов, определяемых по механизму мутагенеза. Эти механизмы подробно рассмотрены в обзорах [28, 29, 44] и поэтому здесь описываются лишь в общих чертах. Мутагены одного класса, обычно называемые мутагенами *in vitro*, действуют путем химической модификации нуклеиновой кислоты, содержащейся в вирусной частице. Азотистая кислота дезаминирует основания, в первую очередь аденин, с образованием гипоксантина, который при последующей репликации спаривается с цитозином. В результате действия азотистой кислоты на аденин происходит транзигция от АТ-пары к GC-паре. Азотистая кислота дезаминирует также цитозин, приводя к транзигции CG→ТА. Другим мутагеном *in vitro* является гидроксилламин; он реагирует специфически только с цитозином и вызывает транзигцию CG→ТА. Большой класс мутагенов *in vitro* представлен алкилирующими аген-

тами, которые действуют на многие позиции в основаниях, но предпочтительно алкилируют пурины в положении N-7. Алкилирующие агенты — нитрозогуанидин, этанметансульфонат и метилметансульфонат — являются мощными мутагенами. Во второй класс входят мутагены *in vivo*, которые требуют для своего действия метаболически активной нуклеиновой кислоты. Одна группа мутагенов *in vivo* содержит аналоги оснований, которые включаются в нуклеиновую кислоту в ходе синтеза по правилам нормального спаривания. Включившись, эти аналоги способны претерпевать таутомерные переходы, которые приводят их к спариванию с различными основаниями, вызывая таким образом транзиции и трансверсии. Часто используют аналоги: 2-аминопурин, 5-бромдезоксипуридин и 5-азацитидин. В другую группу мутагенов *in vivo* включены интеркалирующие агенты. Они имеют плоскую структуру с гидрофобными поверхностями и внедряются в стопку оснований. При последующей репликации нуклеиновой кислоты нарушение стопки приводит к вставкам или делециям. Примерами интеркалирующих агентов являются акридиновые красители, такие как профлавин и соединения ICR, синтезированные в Институте раковых исследований в Филадельфии. Ультрафиолет также иногда используют в качестве мутагена. Основным продуктом действия ультрафиолета являются димеры пиримидинов. В ДНК пиримидиновые димеры вырезаются, и считают, что мутации обусловлены неправильным включением оснований в процессе репарации. Для РНК механизм ультрафиолетового мутагенеза неизвестен.

Большинству мутаций присуще свойство возврата (реверсии) к дикому типу. Каждая мутация имеет характерную частоту реверсий, которую можно точно измерить. Частоты обратных мутаций были измерены более точно, чем скорости прямых мутаций, поскольку к мутанту могут быть применены сильные селективные воздействия, что способствует выявлению редких ревертантов. Реверсии можно вызвать мутагенами, и часто знание механизма действия мутагена, применявшегося при получении прямой, а также обратной мутации, может быть использовано для предположительного выяснения типа замены оснований при прямой мутации.

Типы мутантов

У различных вирусов животных выделено большое число разных типов мутантов. От многих мутантов, которых использовали на ранних этапах генетических исследований, впоследствии отказались, поскольку выяснилось, что они возникли вследствие множественных мутаций, или плейотропны. Хорошие мутанты для генетических исследований должны иметь четкое фенотипическое

выражение (полную пенетрантность), легко выявляться, быть достаточно стабильными и быть следствием одной мутации [37]. Этим критериям удовлетворяют мутации многих типов; некоторые из них обсуждаются ниже.

Мутанты по морфологии бляшек

Мутанты по морфологии бляшек имеют измененную морфологию благодаря какой-либо особенности метаболизма по сравнению с диким типом. У аденовирусов мутанты с большими бляшками быстрее по сравнению с диким типом освобождают вирус из клетки [78]. Синцитиальные мутанты (*syn*) таких вирусов, как вирус простого герпеса (*herpes simplex virus*, HSV), вместо типичного цитолитического действия обладают способностью индуцировать слияние соседних клеток [120]. Считают, что у *syn*-мутантов HSV изменено гликозилирование поверхностных белков [72]. Характерные изменения морфологии бляшек описаны для *ts*-мутантов, растущих при перmissive температуре, а особую морфологию бляшек при nonpermissive температуре у реовируса связывают с не полностью летальными *ts*-мутациями [109]. Мутации по морфологии бляшек удобны в качестве неселективных маркеров при многофакторных скрещиваниях [11].

Мутанты по спектру хозяев

Для ряда вирусов выделены мутанты по спектру хозяев. Бенджамин [5] получил мутанты вируса полиомы, способные расти только на клетках, трансформированных вирусом полиомы, но не на нормальных мышинных клетках. Выделены мутанты аденовируса типа 5, способные расти только на клетках человека, но не на клетках хомячков [145]. Сходные мутанты выявлены и для многих других вирусов. Зависимые от хозяина супрессируемые мутации обрыва цепи, с таким успехом применяемые в фаговых системах, в системах с вирусами животных не использовались. У вирусов животных существуют нонсенс-мутанты, которые супрессируются в системах синтеза белка *in vitro* при добавлении супрессорных амбер- или охр-тРНК [46]. Однако широкое использование мутаций этого класса, зависимых от хозяина, возможно только после разработки клеточных линий, содержащих супрессорные тРНК.

Температурочувствительные мутанты

Температурочувствительные мутации — наиболее удобный тип мутаций вирусов животных, в первую очередь благодаря ус-

ловной летальности своего фенотипа. Температурочувствительные мутанты возникают в результате миссенс-мутаций, при которых нуклеотидная последовательность изменяется таким образом, что образующийся белковый продукт не способен принять или сохранять функционально активную конформацию при непермиссивной (высокой) температуре. Однако при низкой (пермиссивной) температуре белок способен принимать функционально активную конформацию, так что мутант сохраняет способность размножаться. Поскольку *ts*-мутанты условно-летальны, теоретически можно получить *ts*-мутации по любому вирусному гену, кодирующему необходимый продукт. В самом деле, для некоторых вирусов *ts*-мутанты выделены по всем вирусным генам [112, 129]. Для других вирусов найдены *ts*-мутанты по многим генам.

Некоторые свойства *ts*-мутантов заслуживают упоминания. *ts*-Мутанты дают полноразмерные белки, которые имеют ту же иммунологическую специфичность, что и белки дикого типа. Про *ts*-мутанты часто говорят, что они «текут». Это означает, что при непермиссивной температуре сохраняется некоторая функциональная активность, хотя функция нарушена настолько, что образуется очень мало инфекционного вируса. Тем не менее при пермиссивной температуре *ts*-мутанты редко функционируют с той же эффективностью, что и дикий тип. Это часто осложняет получение препаратов мутанта с высоким титром, поскольку ревертанты к дикому типу, хотя и редки, но имеют большое преимущество в росте даже при пермиссивной температуре. Если *ts*-мутация расположена в структурном гене, то вирионы, полученные при пермиссивной температуре, могут оказаться термолабильными. Неструктурные белки, несущие *ts*-мутацию, могут быть термолабильными или устойчивыми к теплу, причем последнее относится к случаю, когда они синтезированы и свернуты в стабильную биологически активную конформацию при пермиссивной температуре до переноса в условия с непермиссивной температурой.

Холодочувствительные мутанты

Холодочувствительные (*cs*) мутации с успехом применяли в прокариотических системах в сочетании с *ts*-мутациями для выявления периодов работы определенных генов. Считали, что *cs*-мутанты могут быть полезны также и у вирусов животных. Однако необходимость использования существенно более низкой, чем оптимальная, непермиссивной температуры делает их применение в системах вирусов животных нецелесообразным.

Делеционные мутанты

Спонтанные и индуцированные делеционные мутанты выделены для многих вирусов. Спонтанные делеционные мутации [10] накапливаются в вирусных популяциях, пассируемых при высокой множественности заражения [160, 171]. Разработано несколько процедур для получения делеционных мутаций, зачастую в заранее намеченном месте генома [71, 81]. Во многих делеционных мутантах утеряны важные участки, поэтому для их пассирования требуется присутствие вируса-помощника. В других случаях, когда утрачены несущественные участки генома, делеционные мутанты жизнеспособны и могут размножаться без помощника. Делеционные мутанты удобны при картировании специфических функций и белков в вирусном геноме [71, 81].

Другие маркеры

В различных системах с вирусами животных применяли и многие другие маркеры. Мутанты, устойчивые к ингибиторам, оказались полезными для картирования генома вируса полиомиелита [20] и исследований генов тимидинкиназы и ДНК-полимеразы HSV [141]. В последнее время в качестве генетических маркеров при изучении молекулярных основ этих явлений у ряда вирусов стали использовать различия в вирулентности или специфических патогенных свойствах разных штаммов вирусов [132]. Полезным генетическим маркером в ряде вирусных систем являются также различия в электрофоретической подвижности нуклеиновых кислот и белков.

Использование *ts*-мутантов для анализа функций гена

Характеризация *ts*-мутанта в отношении синтеза вирусных нуклеиновых кислот и белков часто позволяет найти измененную специфическую функцию и таким образом выявить вирус-специфическую активность. Мутанты могут быть исследованы при непермиссивной температуре на синтез дочерних геномов, вирусной РНК и вирус-специфических ферментов и белков. Мутанты можно также проверить на специфические дефекты в сборке дочерних вирионов и вирус-специфические воздействия на синтез макромолекул клетки-хозяина. В общем хотя с каждым мутантом связан свой фенотип, мутанты могут иметь изменения сразу в нескольких этапах метаболизма макромолекул или сборки вирусов по сравнению с диким типом. Такой плейотропный фенотип индивидуальных мутантов может быть следствием нескольких возможных действий мутации. а) Мутация может быть

не полностью летальной, т. е. «текучей», или лики-мутацией, и вследствие этого только частично блокировать соответствующую функцию. б) Мутация может быть истинно плейотропной, т. е. затрагивать несколько функций вируса. в) В результате нарушения мутацией одной функции может начать функционировать альтернативный метаболический путь. г) Мутант может содержать несколько мутаций и поэтому быть дефектным по нескольким функциональным путям. Несмотря на эти осложнения, изучение функциональных дефектов, связанных с *ts*-мутациями, дало массу полезной информации о функциях индивидуальных вирусных генов.

После выявления специфической функции, нарушаемой *ts*-мутацией, можно определить время в репликативном цикле вируса, когда эта функция реализуется. Этого достигают в опытах по изменению температуры, при которой выращивается вирус. Такие опыты ставятся следующим образом [37]. Культуру, зараженную при высокой множественности, инкубируют вначале при перmissive (опыты shift-up) или nonpermissive температуре (опыты shift-down) и через определенные промежутки времени переносят соответственно в условия nonpermissive или permissive температуры. По завершении цикла размножения вируса все культуры анализируют на продукцию инфекционного вируса. Мутанты с дефектными ранними функциями дают хороший выход в опытах типа shift-up и плохой в опытах типа shift-down. В том случае, если *ts*-дефект реализуется поздно в репликативном цикле, наблюдается обратная ситуация. Сочетание опытов типа shift-up и shift-down позволяет довольно точно определить время реализации мутантной функции в репликативном цикле.

Классическим примером использования *ts*-мутантов для исследования функции гена являются мутанты *tsA* SV40. Неспособность ряда мутантов *tsA* трансформировать клетки при nonpermissive температуре указывала на то, что мутанты дефектны по функции трансформации [147]. Однако, когда клетки, трансформированные при permissive температуре, проверяли на фенотип после переноса в условия nonpermissive температуры (shift-up), некоторые мутанты сохраняли трансформированный фенотип, в то время как другие не сохраняли. Эти результаты показали, что функция *tsA* требуется для установления трансформации, но лишь в некоторой степени нужна для поддержания состояния трансформации.

Генетические взаимодействия между вирусами

Основным методом исследования генетических взаимодействий между вирусами служит смешанное заражение клеток куль-

туры тканей. Эти исследования позволили, во-первых, осуществить функциональное группирование мутантов (комплементация) и, во-вторых, обозначить мутации на линейных картах или поместить их в группы рекомбинации (рекомбинация). Тесты на комплементацию и рекомбинацию являются двумя наиболее полезными приемами, доступными генетикам.

Комплементация

Комплементацией называют взаимодействие генных продуктов вируса в смешанно-инфицированных клетках, которое приводит к увеличению выхода одного или обоих вирусов, в то время как их генотип остается неизменным. Это определение отражает тот факт, что один или оба вируса (мутанта) предоставляют белковый продукт, по которому другой партнер дефектен, что позволяет одному или обоим мутантам расти в смешанно-инфицированных клетках. Следовательно, если оба «родителя» дефектны по одному и тому же генному продукту (функции), то ни один из них не способен обеспечить недостающую функцию, и комплементации не происходит. Таким образом, тест на комплементацию можно использовать для классификации и объединения вирусных мутантов в различные функциональные группы. Полагают, что два мутанта, неспособные комплементировать друг друга, имеют дефект в одном и том же гене и генном продукте, тогда как мутанты, способные ко взаимной комплементации, имеют дефект в различных генах и генных продуктах. Деление мутантов на комплементационные группы может быть проведено без всякого знания специфических биохимических дефектов этих мутантов. Теоретически возможно столько же комплементационных групп, сколько и генов. Однако абсолютная летальность некоторых мутаций или несущественная функция других часто приводит к тому, что число комплементационных групп меньше числа генов.

Тест на комплементацию легче всего проводить с мутантами условно-летального типа. Для постановки такого теста клетки заражают совместно двумя мутантами, а в качестве контроля используют клетки, зараженные этими мутантами по отдельности. Зараженные клетки инкубируют в непермиссивных условиях (при высокой температуре в случае *ts*-мутантов). По истечении времени, достаточного для роста вируса, определяют суммарный выход при смешанной и раздельной инфекции, титруя вирус при пермиссивных условиях (низкой температуре в случае *ts*-мутаций). Индекс комплементации рассчитывают как отношение урожая вируса при смешанном заражении к сумме урожая в раздельно зараженных контролях. Комплементацию измеряют по увеличению урожая при смешанной инфекции. Индекс компле-

ментации $> 1,0$ указывает на комплементацию. Для того чтобы снять эффект множественности и другие факторы, влияющие на выход при смешанной инфекции, обычно считают значимыми индексы комплементации, превышающие 2,0. Поскольку в условиях комплементации происходит рост вируса, может происходить и рекомбинация, что приводит к появлению в урожае смешанной инфекции рекомбинантов дикого типа. В связи с этим в уравнение подсчета индексов комплементации вводят дополнительный член для учета вклада рекомбинации в увеличение урожая вируса.

Существуют два типа комплементации. Наиболее типична *неаллельная*, или межгенная, комплементация, при которой мутанты, дефектные по различным функциям, помогают друг другу в репликации, предоставляя функцию, дефектную у другого вируса. Неаллельная комплементация полезна для определения числа различных генов, выявляемых с использованием данной коллекции мутантов. Она широко применялась для генетического описания мутантов вирусов животных. *Аллельная*, или внутригенная, комплементация наблюдается намного реже и происходит в том случае, если генный продукт, дефектный у обоих партнеров, образует мультимерный белок [42]. В этом случае различные партнеры имеют дефект в разных доменах одного и того же белка. Если мультимерный белок состоит из субъединиц одного партнера, то он функционально неактивен. Однако, если мультимер состоит из субъединиц от обоих партнеров, он может принять функционально активную конформацию, и будет наблюдаться комплементация. У мутантов вирусов животных известно несколько примеров аллельной комплементации [89].

Комплементация между мутантами может быть асимметричной, или односторонней, когда в потомстве представлен вирус только одного типа. Асимметричная комплементация обнаружена между мутантами вируса полиомиелита [18]. В некоторых вирусных системах комплементации не наблюдается [14], хотя неспособность к комплементации может быть вторичной по отношению к другим свойствам таких мутантов (см. ниже). В других вирусных системах комплементация, напротив, выражена настолько, что измерение других взаимодействий между вирусами затруднено из-за высокого фона, вызванного комплементацией [31].

При отборе вирусных мутантов комплементация часто бывает первым генетическим тестом, который выполняется для этих мутантов. Комплементационный тест достаточно прост и позволяет быстро разделить мутанты на группы по функциям, которые можно далее исследовать другими способами. На комплементацию были проверены практически все коллекции вирусных мутантов, однако особенно полезен этот тест для тех виру-

сов, для которых невозможен рекомбинационный анализ в силу отсутствия у них рекомбинаций, например тогавирусов [103], рабдовирусов [104, 105] и парамиксовирусов [9]. В табл. 7.1 содержатся данные, полученные в стандартных тестах на комплементацию.

Таблица 7.1. Комплементация между *ts*-мутантами вируса Синдбис [103]

Группа комплементации	Мутант	Уровень комплементации ¹⁾ при смешанном заражении											
		<i>ts21</i>	<i>ts19</i>	<i>ts17</i>	<i>ts4</i>	<i>ts24</i>	<i>ts11</i>	<i>ts6</i>	<i>ts2</i>	<i>ts5</i>	<i>ts10</i>	<i>ts23</i>	<i>ts20</i>
A	<i>ts21</i>	—	0,2	0,1	0,1	1,5	17,6	200	43	27	24	н.о. ²⁾	н.о.
A	<i>ts19</i>	—	—	0,4	0,5	3,2	120	485	н.о.	16	19	43	12
A	<i>ts17</i>	—	—	—	н.о.	4,5	30	393	25	31	17	19	23
A	<i>ts4</i>	—	—	—	—	—	9	127	19	н.о.	27	н.о.	8
A	<i>ts24</i>	—	—	—	—	—	4,2	364	22	29	18	16	5
A'	<i>ts11</i>	—	—	—	—	—	—	280	1,8	50	43	н.о.	12
B	<i>ts6</i>	—	—	—	—	—	—	—	62	93	64	68	21
C	<i>ts2</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	1	36	27	5,2
C	<i>ts5</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	345	61	8
D	<i>ts10</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,7	16,7
D	<i>ts23</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8,5
E	<i>ts20</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

¹⁾ Уровень комплементации представляет собой отношение титра вируса, полученного при смешанном заражении двумя *ts*-мутантами при непермиссивной температуре, к сумме титров, полученных при раздельном заражении.

²⁾ н. о. — не определяли.

тацию у вируса Синдбис [103]. На основе этих данных, которые также иллюстрируют некоторые осложнения, часто встречающиеся при комплементационном анализе, использованные мутанты разделены на шесть групп комплементации. Например, мутант *ts11* попадает в комплементационную группу, обозначенную А'. Это связано с получаемыми для него вариациями в результатах. Вначале он был помещен в самостоятельную группу, затем включен в группу А и затем снова помещен отдельно. Поэтому статус мутанта *ts11* и комплементационной группы А' следует рассматривать как неустоявшиеся. Мутант *ts6* из группы В комплементирует со всеми остальными мутантами намного сильнее, чем это наблюдается для других пар. Среди мутантов группы А степень комплементации сильно варьирует. Эти два последних факта показывают, что существует проблема определения уровня, с которого комплементация может считаться значимой, и различения этого уровня от отсутствия комплементации.

Комплементация наблюдается в ряде природных ситуаций в системах с вирусами животных. При пассировании ряда вирусов при высокой множественности заражения спонтанно возникают делеционные мутанты [160]. Такие мутанты характерны для препаратов вирусов, которые интерферируют с диким типом и другими мутантами [65]. Делеционные мутанты не способны расти самостоятельно, но поддерживаются в популяции благодаря комплементации, которую обеспечивает небольшое количество виру-

са с полноценным геномом, присутствующее в популяции (вирус-помощник). Комплементация была обнаружена также у РНК-содержащих трансформирующих опухолеродных вирусов, большая часть которых дефектна по репликации из-за делеции генов, кодирующих репликативные функции [87]. Препараты этих вирусов наряду с дефектными по репликации трансформирующими вирусами содержат родственный вирус, способный к репликации, но дефектный по трансформации. Этот второй вирус спасает дефектный по репликации вирус путем комплементации, поддерживая его существование в популяции вируса. В некоторых случаях к комплементации способны и неродственные вирусы. Например, некоторые аденовирусы человека не могут закончить цикл своей репликации в клетках почек обезьян. Однако в клетках, зараженных SV40 и аденовирусом, синтезируются как SV40, так и аденовирус [98]. Это указывает на то, что два неродственных вируса могут комплементировать, исправляя свои дефекты, связанные с ограничением спектра хозяев.

Рекомбинация

Рекомбинация — это физическое взаимодействие между вирусными геномами в смешанно-зараженной клетке. В результате рекомбинации возникают дочерние геномы, которые содержат генетическую информацию в сочетании, отсутствующем у родителей. У вирусов животных это взаимодействие может происходить двумя различными способами в зависимости от физической организации вирусного генома. У вирусов, имеющих одну геномную молекулу, включая все ДНК-содержащие вирусы и часть РНК-содержащих вирусов, рекомбинация включает разрыв и воссоединение ковалентной связи в нуклеиновой кислоте с образованием дочерних геномов неродительского типа (внутримолекулярная рекомбинация). У вирусов с сегментированным геномом, включая вирусы гриппа, реовирусы, буньявирусы и аренавирусы, в ходе рекомбинационного процесса ковалентные связи не разрываются. Вместо этого сегменты генома перемешиваются случайным образом при помощи механизма, называемого перетасовыванием, или реассортацией (reassortment). Два упомянутых рекомбинационных механизма имеют важное значение для рекомбинационного поведения, наблюдаемого у мутантов. В системах, где рекомбинация происходит по механизму разрыв — воссоединение вероятность того, что рекомбинационное событие произойдет между двумя мутациями, пропорциональна физическому расстоянию между этими мутациями на хромосоме. Пары мутантов обнаруживают непрерывный ряд частот рекомбинаций вплоть до теоретического максимума 50%. Этот ряд позволяет выстроить мутанты на линейной карте, где каждая мутация точ-

но локализована по отношению к остальным мутациям на хромосоме. Максимальная теоретическая частота рекомбинации, равная 50%, следует из частоты генетических обменов, которые могут происходить между отдаленными маркерами. Рекомбинантным сочетанием этих маркеров будут обладать только дочерние хромосомы с нечетным числом рекомбинационных событий между маркерами, и, если рекомбинационных обменов будет много, лишь 50% будут содержать требуемое нечетное число обменов.

У вирусов с сегментированным геномом наблюдается иной тип рекомбинации. При парных скрещиваниях мутантов частота рекомбинации либо очень высока, либо рекомбинация не обнаруживается вовсе. Такая рекомбинация по типу «все или ничего» интерпретируется следующим образом: в случае отсутствия рекомбинации считают, что обе мутации расположены на одном и том же сегменте генома, так что обмен сегментами не приводит к появлению сочетания маркеров, отличного от родительского (сегменты, не имеющие мутаций, могут обмениваться с образованием неродительских комбинаций, однако последние нельзя выявить). В парах мутантов, для которых наблюдается высокая частота рекомбинаций, считают, что мутации располагаются в различных сегментах генома, и таким образом обмен сегментами при скрещивании может дать неродительское сочетание маркеров (сегменты, которые не несут мутаций, естественно, также могут обмениваться). Никакого градиента частот рекомбинаций при этом не обнаруживается; это указывает на то, что внутримолекулярная рекомбинация по механизму разрыв — воссоединение не происходит с заметной частотой. В системах, в которых происходит обмен маркеров, ожидаемая частота рекомбинации составляет 50%. Однако такая частота редко наблюдается, поскольку на реассортацию сегментов генома могут влиять многочисленные пока плохо изученные факторы.

Рекомбинационный анализ легче всего проводить с мутантами условно-летального типа. Для проведения тестов на рекомбинацию клетки подвергают смешанному заражению мутантами двух типов, а также заражению мутантами по отдельности. Зараженные клетки инкубируют при перmissive условиях в течение времени, достаточного для завершения цикла репликации. Урожай вируса в смешанно и отдельно зараженных клетках определяют, титруя вирус в неперmissive условиях, для того чтобы определить количество рекомбинантов, имеющих дикий фенотип, или урожай ревертантов в случае отдельного заражения. При смешанном заражении определяют также полный урожай вируса в перmissive условиях. Частоту рекомбинации вычисляют следующим образом: урожай рекомбинантов дикого типа при смешанном заражении (измеренный при неперmissive

ных условиях) корректируют на вклад реверсии, вычитая из этого урожая сумму урожаяв отдельно зараженных клеток (измеренных при непермиссивных условиях). Затем это число рекомбинантов дикого типа делят на суммарный урожай при смешанном заражении (измеренный при пермиссивных условиях), в результате чего получают долю урожая, которую составляют рекомбинанты дикого типа. Поскольку рекомбинация в популяции реципрокна, долю рекомбинантов дикого типа умножают на 2, для того чтобы учесть двойные мутанты, которые не могут быть обнаружены таким образом. Наконец, долю рекомбинантов приводят к процентам, умножая на 100. Для некоторых вирусов, у которых реципрокность рекомбинации не показана, поправки на двойную рекомбинацию не делают, и частоты рекомбинации выражают как процент рекомбинантов дикого типа. Другим способом оценки рекомбинации служит определение индекса рекомбинации, который соответствует повышению урожая рекомбинантов дикого типа при смешанной инфекции в непермиссивных условиях по сравнению с урожаями при раздельном заражении. Хотя данные о рекомбинации в форме индексов рекомбинации нельзя использовать для точного расчета карт сцепления, они полезны в случае вирусов с сегментированным геномом, у которых не наблюдается сцепления признаков и рекомбинационные тесты просто либо положительны, либо отрицательны. Индекс рекомбинации используют потому, что его расчет очень прост и требует титрования урожая только при непермиссивных условиях.

Рекомбинационный анализ проводили различными способами с использованием разнообразных маркеров. Ниже мы обсудим некоторые применявшиеся типы рекомбинационного анализа и ту информацию, которая может быть извлечена из каждого из них.

Двухфакторные скрещивания

Двухфакторные скрещивания проводили практически со всеми коллекциями мутантов. На основании знания частот рекомбинации, полученных при попарных скрещиваниях вирусов, рекомбинирующих по механизму разрыв — воссоединение, можно расположить все мутации на линейной карте. Мутанты каждой комплементационной группы обычно располагаются в небольшой области этой карты, что указывает на повреждения в одном гене. Максимальное расстояние между мутациями в одной группе комплементации позволяет получить минимальную оценку размера гена. В табл. 7.2 содержатся типичные результаты, полученные при двухфакторных скрещиваниях; в данном случае использовали *ts*-мутанты HSV-1 [128], для которых градиент ча-

Таблица 7.2. Рекомбинация между *ts*-мутантами HSV-1⁴⁾

Группа компле- мента- ции	Мутант	Частота реверсии мутан- та ²⁾	Частоты рекомбинации при скрещивании <i>ts</i> -мутантов ¹⁾														
			<i>ts16</i>	<i>ts2</i>	<i>ts21</i>	<i>ts4</i>	<i>ts5</i>	<i>ts6</i>	<i>ts17</i>	<i>ts18</i>	<i>ts3</i>	<i>ts8</i>	<i>ts12</i>	<i>ts19</i>	<i>ts20</i>	<i>ts22</i>	
A	<i>ts15g</i>	0,004	3,3	н.о. ³⁾	н.о.	н.о.	н.о.	15,2	12,2	н.о.	н.о.	12,3	н.о.	н.о.	н.о.		
	<i>ts16g</i>	0,028	—	н.о.	18,3	8,5	н.о.	н.о.	15,1	9,8	2,0	н.о.	9,0	7,5	н.о.		
B	<i>ts2b</i>	0,002	—	1,5	29,6	20,1	19,4	38,2	35,5	26,7	25,9	38,7	14,8	29,9	34,5		
	<i>ts21u</i>	0,004	—	—	56,1	20,1	20,7	33,8	36,9	28,2	24,6	36,1	33,2	31,8	32,0		
C	<i>ts4b</i>	0,019	—	—	—	0,8	1,5	14,2	17,9	9,2	3,4	9,2	3,4	4,6	3,2		
E	<i>ts5b</i>	0,003	—	—	—	—	0,001	15,6	16,8	5,6	5,5	19,0	0,3	9,7	14,0		
	<i>ts6b</i>	0,002	—	—	—	—	—	17,4	14,4	5,3	5,4	20,5	13,2	11,1	12,4		
F	<i>ts17g</i>	0,014	—	—	—	—	—	—	0,04	8,6	9,3	3,2	2,6	6,1	2,0		
	<i>ts18g</i>	0,001	—	—	—	—	—	—	—	10,8	11,1	1,6	2,4	7,4	3,8		
G	<i>ts3b</i>	0,003	—	—	—	—	—	—	—	—	0,9	13,5	23,1	2,4	6,4		
	<i>ts8b</i>	0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15,0	5,9	3,8	7,3		
J	<i>ts12g</i>	0,008	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11,1	7,3	4,3		
M	<i>ts19u</i>	0,022	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	41,1	31,4		
N	<i>ts20u</i>	0,026	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	22,6		

¹⁾ Частоты рекомбинации рассчитывали, как описано в тексте. Внесена поправка на не-регистрируемые двойные мутанты.

²⁾ Частоты реверсии представлены в виде доли вируса дикого типа, получаемой при ауто-крассах.

³⁾ Не определяли.

⁴⁾ Видоизменено с разрешения из работы [128].

стот рекомбинации составляет от менее 1% до немного больше 50%. Эти данные согласуются с единственным линейным расположением мутаций, причем расстояние между ними определяется частотами рекомбинаций (рис. 7.1). Приведенный пример иллюстрирует некоторые свойства данных, получаемых при двух-факторных скрещиваниях. Карта простирается на 38,7 единиц рекомбинации между двумя наиболее удаленными маркерами, и 37,2 единицы, если суммировать расстояния между соседними маркерами. Таким образом, ожидаемая аддитивность рекомби-национных частот оказывается вполне удовлетворительной. Од-нако два мутанта в табл. 7.2 (*ts4b* и *ts19u*) дают рекомби-национные частоты, которые неаддитивны с другими мутантами и поэтому не могут быть включены в эту карту (рис. 7.1). Такие мутанты, как *ts15g* и *ts16g*, нельзя поместить на карту до тех пор, пока они не будут скрещены со всеми другими мутантами. На основании того небольшого числа скрещиваний, которое про-ведено с ними, можно предположить, что они располагаются либо справа, либо слева от мутантов групп F и J.

Данные, получаемые при двухфакторных скрещиваниях ви-русов с сегментированным геномом, совершенно иные. Механизм «все или ничего», действующий при обмене сегментами, не поз-воляет расположить мутации на линейной карте. Данные по ре-комбинации реовируса [112] приведены в табл. 7.3. Частоты ре-

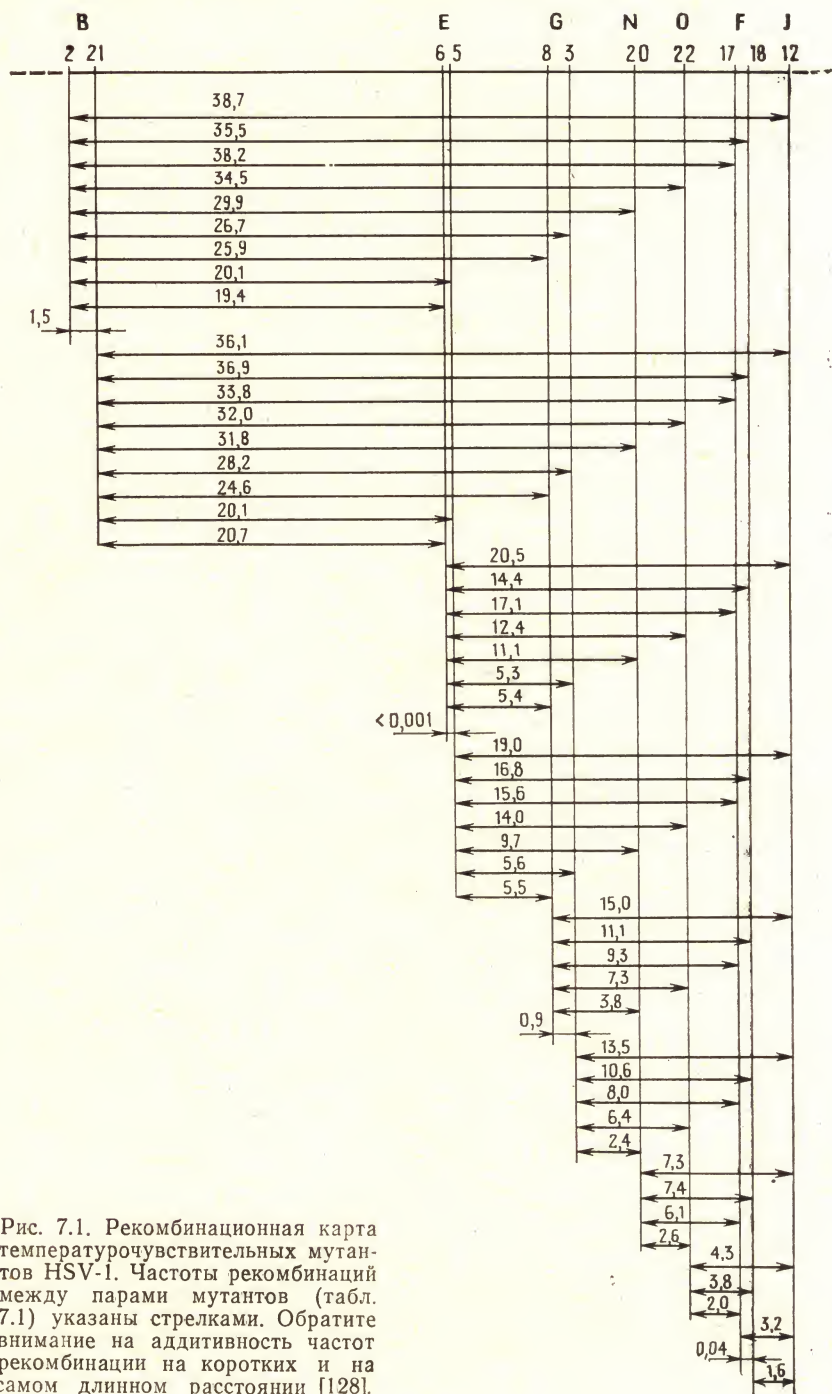


Таблица 7.3. Рекомбинация между прототипными мутантами реовируса [112]

Мутант	Процент ts^+ -рекомбинантов при скрещивании ¹⁾									
	<i>tsA</i> (201)	<i>tsB</i> (352)	<i>tsC</i> (447)	<i>tsD</i> (357)	<i>tsE</i> (320)	<i>tsF</i> (556)	<i>tsG</i> (453)	<i>tsH</i> (26/8)	<i>tsI</i> (138)	<i>tsJ</i> (128)
<i>tsA</i> (201)	—	3,06	3,81	4,43	4,13	2,04	5,90	2,31	0,95	3,42
<i>tsB</i> (352)		—	3,73	2,08	5,01	2,37	1,89	6,91	3,42	2,30
<i>tsC</i> (447)			—	7,93	8,31	1,52	8,61	10,99	9,00	2,67
<i>tsD</i> (357)				—	9,26	3,75	6,37	10,93	5,30	7,01
<i>tsE</i> (320)					—	5,61	7,80	5,39	2,43	3,31
<i>tsF</i> (556)						—	1,59	2,28	0,93	3,53
<i>tsG</i> (453)							—	6,35	3,64	6,78
<i>tsH</i> (26/8)								—	3,57	3,71
<i>tsI</i> (138)									—	2,65
<i>tsJ</i> (128)										—

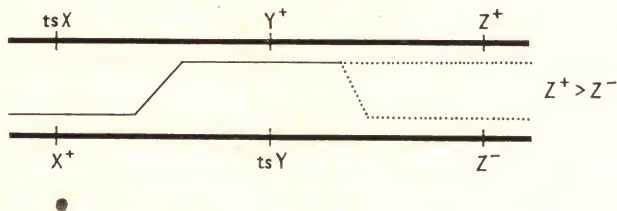
¹⁾ Частоты рекомбинаций представляют собой центр ts^+ -рекомбинантов без коррекции на двойные мутанты.

комбинаций десяти исследованных рекомбинантов варьируют от 0,93 до 10,99%. Хотя наблюдается градиент частот, мутанты нельзя упорядочить в единую самосогласованную аддитивную линейную карту. Кроме того, статистический анализ повторных скрещиваний некоторых из этих мутантов показал, что они не имеют взаимного сцепления [38]. Отсутствие сцепления ожидалось для рекомбинации по механизму обмена сегментами. Однако частоты ts^+ -рекомбинантов значительно ниже теоретических 25%, ожидаемых для системы со свободным обменом сегментами. Причина низких частот рекомбинантов у обменивающихся сегментами вирусов пока не выяснена; не исключено, что это связано с другими свойствами мутантов (см. ниже).

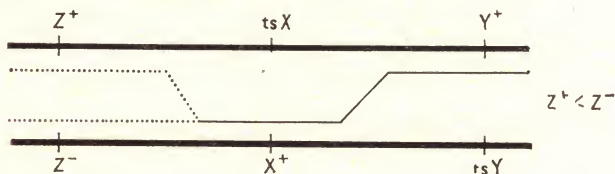
Трехфакторные скрещивания

Трехфакторные скрещивания полезны для определения сцепления между мутантами и для установления порядка тесно сцепленных мутаций у однохромосомных вирусов, рекомбинирующих по механизму разрыв — воссоединение. Когда маркеры очень далеки или очень близки, аддитивность рекомбинации нарушается, и генетик часто вынужден обратиться к трехфакторному скрещиванию для выяснения неточностей на карте. Как следует из названия, трехфакторное скрещивание предполагает использование трех мутаций, причем рекомбинантов отбирают по двум из них и не отбирают по третьей. В случае вирусов животных два селектируемых мутанта обычно принадлежат к ts -типу, а третьим маркером является такой, по которому или

А. Неселектируемый маркер справа от Y



Б. Неселектируемый маркер слева от X



В. Неселектируемый маркер между X и Y

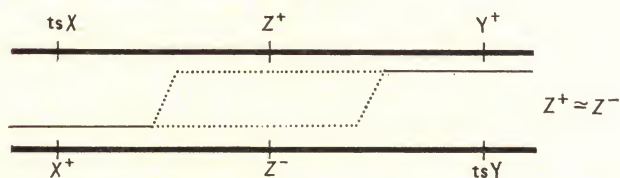


Рис. 7.2. Схема трехфакторного скрещивания для определения взаимного порядка близких маркеров и выявления сцепления между отдаленными маркерами. Схемы А, Б и В показывают рекомбинационные события при трех возможных ориентациях маркеров в скрещивании $tsXY^+Z^+ \times X^+tsYZ^-$. Родительские геномы показаны жирной линией. Рекомбинационные события, отбираемые у ts^+ -потомства, показаны более тонкой сплошной линией, а рекомбинационные события, влияющие на аллели неселектируемого локуса Z, — пунктиром. Справа от каждого варианта показаны ожидаемые распределения неселектируемого маркера Z.

против которого отбор в ходе селекции ts^+ -рекомбинантов не ведется. Таким образом проводят скрещивание типа $tsXtsY^+Z^+ \times tsX^+tsYZ^-$. Отбирают рекомбинанты tsX^+tsY^+ , не обращая внимания на маркер Z. Затем определяют характер распределения Z^+ и Z^- у ts^+ -рекомбинантов. Соотношение Z^+/Z^- используют для определения порядка близких маркеров и сцепления между отдаленными маркерами. Три возможных результата скрещивания $tsXtsY^+Z^+ \times tsX^+tsYZ^-$ схематично представлены на рис. 7.2.

Распределение маркера Z у tsX^+tsY^+ -рекомбинантов определяется его положением по отношению к локусам X и Y . Если Z расположен слева или справа от обоих маркеров X и Y , то среди рекомбинантов ts^+ -типа будет преобладать один тип маркера Z . Величина неравномерности распределения Z^+ и Z^- зависит от расстояния (сцепления) локуса Z от ближайшего ts -локуса (tsX или tsY). Например, в случае A , когда локус Z расположен справа от обоих локусов X и Y , доля Z^+ в ts^+ -рекомбинантах будет увеличиваться по мере приближения Z к Y , поскольку физическое расстояние, на котором может произойти второй перекрест (обозначенный пунктиром), становится меньше. Наоборот, по мере удаления Z от Y вероятность второго перекреста увеличивается, и преобладание Z^+ над Z^- становится меньше. Однако, даже если Z очень удален от Y , слабое сцепление остается, и в ts^+ -рекомбинантах Z^+ будет представлен чуть больше, чем Z^- . Обычно маркер Z выбирают так, что он лежит вне маркеров X и Y . Однако если локус Z расположен между X и Y , то распределение Z^+ и Z^- будет приблизительно равномерное в силу примерного равенства шансов на перекрест между локусами Z и X и между локусами Z и Y . Однако если Z расположен между X и Y и находится ближе к одному из них, то распределение Z^+ и Z^- становится неравномерным. В этом случае постановка скрещиваний $tsXtsY^+Z^- \times tsX^+tsYZ^+$ может прояснить, находится ли Z между, левее, либо правее ts -маркеров. В идеальном случае при проведении трехфакторных скрещиваний неселектируемый маркер помещают в оба возможных положения по отношению к ts -маркерам. Такая реципрокная ориентация маркеров дает однозначные результаты.

Применительно к вирусам с сегментированным геномом трехфакторные скрещивания не имеют широкого распространения. Это связано с тем, что рекомбинация проходит по механизму обмена сегментами. Сцепленными оказываются только те маркеры, которые расположены в одном сегменте генома, а поскольку в этих системах рекомбинаций внутри сегментов не наблюдается, такое сцепление оказывается абсолютным. Так, при скрещивании типа $tsXtsY^+Z^+ \times tsX^+tsYZ^-$ маркер Z будет распределяться случайным образом, если маркеры X , Y и Z расположены в разных сегментах генома. Если, например, Z^+ был бы в том же сегменте, что и tsY^+ , то все ts^+ -рекомбинанты были бы Z^+ из-за абсолютного сцепления между tsY^+ и Z^+ .

Трехфакторные скрещивания использовали в многочисленных исследованиях с применением мутантов вирусов животных. Например, мутацию синцитиальной морфологии бляшек использовали в качестве неселектируемого маркера в трехфакторных скрещиваниях ts -мутантов HSV-1 [11]. Круг хозяев, определяемый хелперной функцией Ad2+ND1, использовали в качестве

маркера в трехфакторных скрещиваниях между *ts*-мутантами аденовируса типа 5 и Ad2+ND1 [53]. У вируса полиомиелита в трехфакторных скрещиваниях *ts*-мутантов использовали мутацию резистентности к гуанидину [19]. Мутант, индуцирующий вирусный белок с измененной электрофоретической подвижностью, использовали в качестве неселектируемого маркера в трехфакторных скрещиваниях *ts*-мутантов реовируса [21]. Таким образом, в качестве неселектируемого маркера в трехфакторных скрещиваниях *ts*-мутантов может быть использована практически любая мутация. Однако совершенно необходимо показать, что при температурном отборе, который применяют к *ts*-мутантам при скрещивании, маркер на самом деле является неселектируемым.

Многофакторные скрещивания

Исследования вирусов животных с использованием более чем трех маркеров в каждом из родителей относительно немногочисленны в основном из-за сложности получения множественных мутантов. Несколько работ выполнено с использованием *ts*-признака, морфологии бляшек, резистентности к ингибиторам и некоторых других биохимических признаков в различных сочетаниях. В одном из таких исследований удалось выявить ранее не замеченное сцепление маркеров у HSV-1 [63].

Межтипные скрещивания

В течение последних 10 лет в генетических исследованиях в качестве двух партнеров при скрещивании часто применяли различные серотипы или штаммы одного и того же вируса. Как правило, в этих скрещиваниях используют *ts*-мутации в одном или обоих партнерах. Вместе с тем межтипные или штаммовые различия двух родителей дают большое число дополнительных удобных маркеров для скрещивания. Следовательно, межтипные скрещивания — это особый случай многофакторного скрещивания, в котором для определения распределения неселектируемых маркеров в рекомбинантном потомстве серотипо- или штаммоспецифические признаки требуют биохимического или биологического анализа.

Чаще всего в качестве маркеров используют серотипо- и штаммоспецифические различия в электрофоретической подвижности нуклеиновой кислоты. У вирусов с ДНК-геномом маркерами нуклеиновой кислоты служат различной величины фрагменты, получаемые при расщеплении ДНК рестрикционными эндонуклеазами. У вирусов с сегментированным геномом наблюдается естественный полиморфизм, который выражается в разных скоростях миграции геномных сегментов вирусов, используемых в качестве родительских. На рис. 7.3 приведен пример ис-

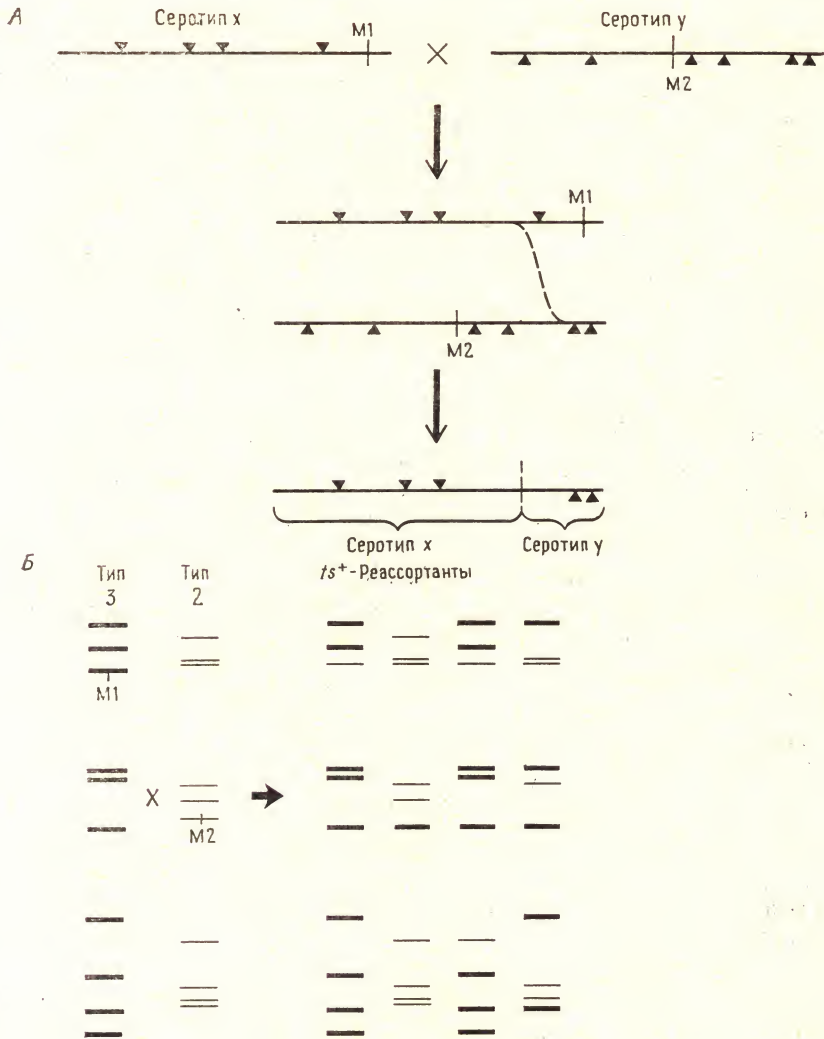


Рис. 7.3. Схема межтипных скрещиваний между мутантами ДНК-содержащего вируса (в А аденовируса, [53]), и РНК-содержащего вируса с сегментированным геномом (в Б реовируса). Скрещиванию подвергали *ts*-мутанты M1 и M2, принадлежащие к различным серотипам, после чего отбирали *ts*⁺-рекомбинанты. В случае аденовируса (А) для каждого рекомбинанта определяли рестрикционную карту. Распределение рестрикционных фрагментов от обоих родителей позволяет выявить положение *ts*-мутации каждого родителя. В случае реовируса (Б) выясняли родительскую принадлежность каждого сегмента. Распределение сегментов с *ts*⁺-фенотипом позволяет сделать вывод о расположении *ts*-мутаций в сегментах обоих родителей.

пользования размера фрагментов нуклеиновой кислоты или скорости миграции сегментов в качестве маркеров в сочетании с *ts*-мутациями для вирусов, содержащих ДНК, или РНК-вирусов с сегментированным геномом. Два *ts*-мутанта скрещивают и отбирают *ts*⁺-рекомбинантное потомство. В случае ДНК-содержащих вирусов (рис. 7.3, А) ДНК каждого *ts*⁺-рекомбинанта расщепляют рестрикционной эндонуклеазой и продукты сравнивают при помощи электрофореза с рестрикционными фрагментами каждого из родительских штаммов. При этом сравнении могут быть идентифицированы фрагменты, полученные от каждого из родителей. Обычно у *ts*⁺-рекомбинанта находится один фрагмент, который не идентичен ни одному из фрагментов родительских штаммов. Этот фрагмент — составной: он содержит нуклеотидные последовательности от обоих родителей и соответствует месту перекреста. В случае РНК-содержащих вирусов с сегментированным геномом (рис. 7.3, Б) с помощью электрофореза сравнивают РНК *ts*⁺-рекомбинантов и родительских *ts*-штаммов. В обоих случаях можно определить долю генома каждого родителя в геноме рекомбинанта. Рестрикционный фрагмент или сегмент генома, содержащий *ts*-мутацию, определяют благодаря тому, что он исключается из всех *ts*⁺-рекомбинантов. Анализ распределения таких фрагментов или сегментов у большого числа *ts*⁺-рекомбинантов позволяет точно идентифицировать фрагмент или сегмент у каждого партнера, содержащий маркеры, против которых шел отбор. В результате можно точно физически картировать *ts*-мутации в ДНК-геноме; кроме того это единственный способ локализации мутаций в сегментах вирусов с сегментированным геномом.

Маркером может также служить серотип- и штамм-специфический полиморфизм электрофоретической подвижности вирусных белков. После того как установлена родительская принадлежность каждого рестрикционного фрагмента или сегмента генома, можно определить родительскую принадлежность белков, синтезируемых этим клоном. Анализ ряда рекомбинантных клонов показывает, что присутствие белков от одного родителя всегда коррелирует с определенным рестрикционным фрагментом от этого родителя. Таким образом, исследуемый белок всегда ведет себя при скрещивании аналогично фрагменту или сегменту, которым он кодируется. Этим методом установлено физическое положение генов, кодирующих специфические вирусные белки для большого числа вирусов.

В дополнение к картированию *ts*-мутаций и белков в геноме вируса межтиповые скрещивания использовали для большого числа других маркеров. Например, так картирован гемагглютинин, кодируемый некоторыми вирусами [100, 165]. В межтиповых скрещиваниях локализованы также вирусные гены, существен-

ные для иммунного ответа хозяина и для патогенеза [132]. В общем этим методом может быть картировано и отнесено к специфическому гену любое свойство, которое различается у двух родительских штаммов. Единственное условие состоит в том, что родительские штаммы должны различаться по рестрикционным фрагментам или сегментам генома таким образом, чтобы распределение анализируемого свойства могло быть скоррелировано с распределением фрагментов или сегментов.

Механизмы рекомбинации

Механизмы рекомбинации в системах вирусов животных еще мало изучены, а мутанты, имеющие специфические рекомбинационные дефекты, пока не выделены. Последнее означает, что либо рекомбинация осуществляется ферментами клетки-хозяина, либо она представляет собой жизненно важную вирусную функцию.

Внутримолекулярная рекомбинация

Как полагают, у однохромосомных ДНК-содержащих вирусов рекомбинация осуществляется по механизму разрыв — воссоединение, изученному на бактериофагах и бактериях [94]. У ДНК-содержащих вирусов рекомбинация очевидно выполняется ферментами клетки-хозяина, хотя некоторые вирусы кодируют ферменты, которые могли бы принимать участие в рекомбинации. Различные модели рекомбинации в прокариотических и эукариотических клетках подробно обсуждаются в ряде обзоров и книг [30, 43, 107, 140] и поэтому не будут здесь рассматриваться. Недавно к ДНК-содержащим вирусам животных было привлечено внимание как к модели для исследования рекомбинации в эукариотических клетках [162]. Изученные свойства внутримолекулярной рекомбинации ДНК-содержащих вирусов животных согласуются с несколькими моделями механизма разрыв — воссоединение [8, 169, 172].

Механизм рекомбинации у однохромосомных РНК-содержащих вирусов — давняя загадка и только в последнее время идентичная рекомбинация у вируса полиомиелита и вируса ящура могли бы принимать участие в рекомбинации. Внутримолекулярная рекомбинация у вируса полиомиелита и вируса ящура известна давно, но лишь сейчас получены ее генетические и биохимические доказательства [75, 76, 153]. Исследователям, работавшим с этими вирусами, удалось показать рекомбинантное расположение биохимических маркеров и последовательностей РНК, а также *ts*-маркеров в предполагаемом рекомбинантном потомстве. Они полагают, что внутримолекулярная рекомбина-

ция у вируса ящура происходит по механизму смены матриц, но детали его пока не выяснены.

Один случай внутримолекулярной рекомбинации обнаружен в сегментированном геноме вируса гриппа [40, 96]. Оказалось, что нуклеотидная последовательность маленького РНК-сегмента дефектного интерферирующего вируса (см. ниже) состоит из последовательностей, происходящих из двух нормальных сегментов РНК. Это указывает на то, что они произошли в результате внутримолекулярной рекомбинации между двумя сегментами генома. Анализ структуры родительских и малых сегментов показал, что рекомбинация произошла вблизи короткой области гомологии между двумя сегментами. Для объяснения механизма рекомбинации предложен механизм смены матриц, а местом перескока полимеразы, возможно, является область гомологии.

Делеции, происходящие в сегментах при образовании дефектных интерферирующих (ДИ) частиц вируса, также, вероятно, возникают в результате внутримолекулярной рекомбинации. У ДИ-частиц ДНК-содержащих вирусов рекомбинация может происходить обычным путем. В случае РНК-содержащих вирусов механизм неизвестен, но предполагают, что это механизм смены матрицы [83].

Обмен сегментами генома

Вирусы с сегментированным геномом обычно имеют слишком низкое отношение частиц к бляшкообразующим единицам, чтобы предполагать случайный выбор сегментов из внутриклеточного пула. Поэтому в зараженной клетке должен существовать активный механизм, обеспечивающий получение каждой частицей по одной копии каждого сегмента генома. Наиболее логично предполагать, что обмен сегментами происходит на стадии морфогенеза, когда сегменты отбираются из внутриклеточного пула для упаковки, и, следовательно, механизм обмена тесно связан с морфогенезом. Такая связь может объяснять отсутствие мутантов, дефектных по рекомбинации, поскольку при этом оказался бы затронутым и морфогенез. Сведения о путях морфогенеза у этих вирусов довольно скудны и соответственно мало известно о механизме рекомбинации. В зараженной клетке не обнаружено никакой ассоциации сегментов с помощью белков или нуклеотидных последовательностей. Это указывает на то, что каждый сегмент представляет собой независимую молекулу и он должен быть независимо отобран из пула. Идентифицированы белки, избирательно связывающиеся с сегментами РНК [68], однако им не приписано пока какой-либо роли в обмене сегментами. Анализ нуклеотидных последовательностей не выявил каких-либо участков, которые были бы ответственны за обмен [86]. Меха-

низм обмена сегментами остается одним из самых интересных и непонятных вопросов в биологии вирусов животных.

Генетическая реактивация

Генетическая реактивация представляет собой частный случай рекомбинации или обмена сегментами, когда один или оба партнера неинфекционны, однако при смешанном заражении дают потомство, которое несет признаки обоих родителей. Это инфекционное потомство представляет собой рекомбинанты, в которых инактивирующие повреждения неинфекционного родителя элиминированы. Реактивацию между инфекционным и неинфекционным родителями называют кросс-реактивацией, или спасением маркера. В условиях, когда оба партнера неинфекционны, реактивацию называют «множественной». Множественная реактивация может осуществляться только в том случае, если инактивирующие повреждения локализованы в различных участках генома, так что обмен сегментами или рекомбинация могут дать жизнеспособное потомство.

Кросс-реактивация у вирусов животных была использована в различных ситуациях. Например, у вируса гриппа скрещивание между небляшкообразующим, но инфекционным вирусом с бляшкообразующим, но инактивированным облучением вирусом облегчало получение бляшкообразующих рекомбинантов, содержащих маркеры от небляшкообразующего родителя [139]. Кросс-реактивация показана также для ДНК-содержащих вирусов, рекомбинирующих по механизму разрыв — воссоединение [1].

Множественная реактивация обнаружена в ряде вирусных систем (см. обзор [131]). Обычно она происходит между вирусами, инактивированными УФ-светом. Множественная реактивация наблюдалась как между различными штаммами одного и того же вируса, так и между вирусами различных серотипов [90], а также между неродственными вирусами, например аденовирусом типа 12 и SV40 [170].

Негенетические взаимодействия между вирусами

Между вирусами наблюдаются негенетические взаимодействия, которые могут влиять на результаты генетических исследований. Эти негенетические взаимодействия часто приводят к фенотипическому маскированию истинного вирусного генотипа.

Гетерозиготность

В генетике высших организмов гетерозиготность означает состояние, при котором диплоидные хромосомы различаются

по аллельным маркерам в одном или нескольких локусах. У вирусов животных гетерозиготность этого типа обычно не встречается, поскольку, за небольшими исключениями, геномы этих вирусов гаплоидны. Однако геномы ретровирусов полностью диплоидны — они состоят из двух молекул геномной РНК. Ретровирусы могут быть гетерозиготны по всем маркерам, и гетерозигота постулируется в качестве промежуточного этапа при рекомбинации [166]. Частично диплоидны ДНК-содержащие вирусы, в ДНК которых встречаются повторяющиеся последовательности. Возможна также гетерозиготность по диплоидным локусам. Гетерозиготность наблюдается в геноме HSV, у которого концевые и внутренние повторяющиеся последовательности допускают существование некоторых аллелей в двух копиях [133, 161]. Хотя аллели в диплоидных участках обычно идентичны, найдены области облигатной и необлигатной гомологии последовательностей [79, 80]. Выделены рекомбинанты HSV-1 и HSV-2, содержащие гетерозиготные концевые повторы. Гетерозиготность по концевым участкам влияет на изомеризацию генома, которая обычно происходит у герпесвирусов [25, 26].

У некоторых вирусов с гаплоидным геномом обнаружена гетерозиготность, которая обусловлена неправильной упаковкой геномов при созревании, приводящей к возникновению мультиплоидных частиц. Например, у вируса ньюкаслской болезни более 10% потомства, проанализированного при пассировании после скрещивания, содержало оба родительских типа [77]; это указывает на то, что клоны получены из гетерозиготных мультиплоидных частиц. Действительно, в этих вирусных популяциях наблюдалось значительное число мультиплоидных частиц [64]. Комплементация между геномами в гетерополиплоидных частицах была ошибочно интерпретирована как рекомбинация [22]. Мультиплоидных частиц не наблюдали у вирусов без внешней оболочки, у которых структурные ограничения при упаковке делают маловероятным попадание двух геномов в один капсид. Соответственно гетерозиготность у этих вирусов не обнаружена.

Интерференция

У вирусов животных найдено несколько типов интерференции [37]. Наибольший интерес для генетиков представляет гомологичная интерференция, которая проявляется только по отношению к гомологичному вирусу или к близкородственным вирусам (гл. 15).

Одной из форм хорошо изученной гомологичной интерференции является интерференция, наблюдающаяся при серийных пассажах вируса при высокой множественности заражения [65]. В этих условиях суммарный урожай вирусных частиц остается

относительно постоянным, однако урожай инфекционного вируса снижается по мере пассирования. Таким образом, наблюдается интерференция в отношении роста инфекционной части вирусной популяции. Изучение этих интерферирующих вирусных популяций показало, что они содержат значительную долю вирусных геномов (или геномных сегментов) с делециями [66, 160]. Выдвинуто предположение, что делеционные мутанты интерферируют с ростом полного вируса, эффективно конкурируя за компоненты репликационного аппарата, например за полимеразу [65], что приводит к образованию все увеличивающейся доли дефектного интерферирующего вируса. В последнее время предполагают, что хотя дефектный интерферирующий вирус может конкурировать с полным вирусом за компоненты репликационного аппарата, он не обязательно мешает репродукции полного вируса. *ts*-Мутанты могут быть спасены из интерферирующих препаратов реовируса [2], причем эти *ts*-мутанты имеют сильный интерферирующий фенотип. Следовательно, интерферирующий фенотип может определяться не deletированными генами, а мутациями в присутствующих генах.

Гомологичная интерференция наблюдается не только с делеционными мутантами, но и с мутантами других типов. На ряде вирусных систем показано, что *ts*-мутанты интерферируют с ростом вируса дикого типа как при пермиссивной, так и при непермиссивной температурах [14, 74, 174]. Кроме того, *ts*-мутанты способны к интерференции с другими *ts*-мутантами [18], что может влиять на урожай при смешанном заражении в тесте на комплементацию. Интерференция *ts*-мутантов с ростом вируса дикого типа может также влиять на рекомбинационный тест, снижая урожай рекомбинантов, что в свою очередь сказывается на частоте рекомбинаций [14].

Супрессия

Подавление мутантного фенотипа супрессорной мутацией хорошо изучено у бактериофагов и в других системах [50, 51, 55]. В этих системах фенотип вирусной мутации подавляется второй мутацией либо в вирусе, либо в клетке, приводя к реверсии фенотипа вируса, по-прежнему содержащего исходную мутацию (псевдоревертант). У вирусов животных супрессия в достаточной степени не изучена.

Реверсия может происходить по одному из трех путей: а) за счет обратной мутации в том же самом нуклеотиде, что и исходная мутация с полным восстановлением исходной последовательности (истинная реверсия); б) в результате какого-либо события во втором сайте в том же самом гене, что и исходная мутация, например при сдвиге рамки может восстанавливаться

правильная рамка считывания (интрагенная супрессия); в) за счет супрессорной мутации в гене, отличном от гена, содержащего исходную мутацию (экстрагенная супрессия). Два последних варианта составляют генетическую супрессию.

Супрессорная мутация приводит к преодолению дефекта исходной мутации и к восстановлению дикого фенотипа вируса с мутантным генотипом. Супрессию можно доказать возвратным скрещиванием подозреваемого псевдоревертанта с диким типом (оба партнера с диким фенотипом), изучая потомство от скрещивания на присутствие исходных мутаций (мутантного фенотипа). *ts*-Фенотип восстанавливается у части потомства *ts*-мутантов, поскольку *ts*-дефект отделяется от супрессирующей мутации за счет рекомбинации. У вирусов, которые рекомбинируют за счет внутримолекулярного механизма, может наблюдаться как интрагенная, так и экстрагенная супрессия, в то время как у вирусов, рекомбинирующих за счет обмена сегментами, из-за сцепления маркеров в одном сегменте обнаруживается только экстрагенная супрессия. Таким образом, у сегментированных вирусов, для которых супрессия изучена лучше всего, найденные супрессорные мутации принадлежат к экстрагенному типу.

Супрессия *ts*-фенотипа *ts*-мутации впервые обнаружена у реовируса [114]. Возвратное скрещивание необычного ревертанта с диким типом (*ts*⁺) дало высокую частоту потомства, обладавшего *ts*-фенотипом. Кроме того, спасенные *ts*-мутанты были генетически идентичны *ts*-мутанту, из которого этот псевдоревертант был получен. Систематическое исследование ревертантов *ts*-мутантов реовируса из всех групп мутантов показало, что основной причиной появления ревертантного фенотипа была реверсия путем экстрагенной супрессии, поскольку более 90% ревертантов содержало экстрагенно супрессированные *ts*-мутации [110]. В этих исследованиях не удалось обнаружить никаких проявлений супрессорных мутаций помимо супрессорного фенотипа и ничего нового о механизме супрессии у реовируса. Сходная супрессия *ts*-фенотипа наблюдалась у вируса гриппа [97]. Есть сообщение также о подавлении *ts*-повреждений в одном штамме вируса гриппа супрессорной мутацией другого штамма [47, 130]. У HSV описан один случай супрессии [54], когда супрессорная мутация очень тесно сцеплена с подавляемой *ts*-мутацией. Это свидетельствует о том, что обе мутации расположены в одном гене и что супрессия относится к интрагенному типу. Явления, напоминающие супрессию, наблюдаются у ревертантов вируса осповакцины [92] и вируса ящура [76], однако пока эти псевдоревертанты не были исследованы генетически.

Супрессия мутантного фенотипа очевидно представляет собой феномен, имеющий биологическое значение для вирусов животных. Высокая частота экстрагенной супрессии, наблюдаемая

у реовирусов, указывает на то, что супрессия может представлять собой общий механизм, благодаря которому РНК-содержащие вирусы, не имеющие промежуточных стадий ДНК в жизненном цикле, могут обойти эффекты нежелательных мутаций [108, 110]. Этот механизм позволяет обходить эффекты спонтанно накапливаемых вредных мутаций, которые не могут быть элиминированы (или элиминируются очень неэффективно) за счет рекомбинации РНК-геномов. Вакцина против вируса гриппа, которая была аттенуирована за счет *ts*-мутаций, при испытании обнаружила способность давать супрессированные псевдоревертанты [97]. Испытания на добровольцах показали, что псевдоревертанты восстановили вирулентный фенотип, очевидно в результате супрессии аттенуирующей мутации [152].

Фенотипическое смешивание

Фенотипическим смешиванием называют процесс, в результате которого индивидуальная вирусная частица, образовавшаяся при смешанной инфекции, получает структурные белки (капсида или оболочки), происходящие от обоих родительских вирусов. В крайнем варианте дочерний геном, генотипически идентичный геному одного из родителей, упаковывается в капсид или оболочку, определяемую другим родителем. Смешивание геномов и структурных белков приводит к образованию вирусных частиц, в которых фенотипические свойства вирусов не отражают фенотипических потенций генома. Тем не менее при последующем заражении экспрессия генома приводит к образованию потомства, в котором фенотип соответствует генотипу. Таким образом, фенотипическое смешивание представляет собой переходящий феномен.

Фенотипическое смешивание довольно широко распространено у вирусов без оболочки, близкородственных между собой. Способность капсидных белков смешиваться и давать урожай инфекционного вируса предполагает, что смешанные белки должны играть весьма сходную структурную роль в вирионе. Фенотипическое смешивание структурных антигенов наблюдали между близкородственными вирусами, такими как вирусы полиомиелита типов 1 и 2 [84], и между более отдаленными родственниками, такими как вирусы ЕСНО 7 и Коксаки А9 [69]. В некоторых случаях фенотипического смешивания большая часть потомства имела полностью гетерологичный капсид (транскапсидация) [115]. Патогенные вирусы, например вирус ящура и бычий энтеровирус [156] или вирус полиомиелита и вирус Коксаки [57], дают транскapсидацию *in vitro*, что может иметь эпидемиологические последствия в том случае, если транскapсидация происходит также и *in vivo*.

Фенотипическое смешивание свободно протекает у ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов с оболочкой. У этих вирусов фенотипическое смешивание часто происходит таким образом, что нуклеокапсид данного вируса оказывается заключенным в оболочку, определяемую другим вирусом; это явление получило название «образование псевдотипа». Комплементация, наблюдаемая между дефектными по репликации РНК-содержащими опухолеродными вирусами и их помощниками (см. выше), приводит к образованию псевдотипов, поскольку поверхностные гликопротеины обычно кодируются вирусом-помощником. Вирус везикулярного стоматита образует псевдотипы с рядом других вирусов, имеющих оболочку, включая вирус чумы птиц [176], группы птичьих и мышиных РНК-содержащих опухолеродных вирусов [175], и HSV [67]. Тем не менее в процессе образования вирусов с оболочкой одних вирусов и нуклеокапсидами других существуют ограничения, на что указывает отсутствие фенотипического смешивания между вирусом везикулярного стоматита и вирусом Синдбис [12]. Не все фенотипически смешанные частицы вирусов с оболочкой представляют собой псевдотипы. Может происходить также смешивание белков оболочки, что приводит к образованию вирионов, нейтрализуемых антисыворотками к обоим родителям [175].

Дефектность

Понятие дефектных вирусов введено при рассмотрении вирусной интерференции. Дефектные интерферирующие (ДИ) популяции представляют собой наиболее изученный случай дефектных вирусов. ДИ-частицы накапливаются в препаратах вируса, который подвергался серийным пассажам при высокой множественности заражения. ДИ-частицам присущи три основные свойства: дефектность, способность к интерференции и способность к самообогащению [65]. Дефектность предполагает, что ДИ-вирусы имеют повреждения в важных генах. Для большинства ДИ-частиц мутации представляют собой делеции, но они могут быть и точечными. Способность к интерференции означает, что ДИ-частицы препятствуют росту полного вируса-помощника или других гомологичных вирусов. Третьим свойством ДИ-вирусов является способность к самообогащению за счет стандартного вируса. ДИ-частицы наблюдались у многих вирусов; лучше других изучены дефектные частицы вируса везикулярного стоматита. Они содержат дефектный геном, более короткий, чем геном стандартного вируса, и могут быть очищены при помощи зонального скоростного центрифугирования (см. обзоры [60, 65]). ДИ-Частицы, выделенные из препаратов многих других вирусов, также обладают свойствами дефектности, способности

к интерференции и способности к самообогащению, равно как и многими другими свойствами, изученными в случае ДИ-частиц вируса везикулярного стоматита.

Не исключено, что ДИ-частицы имеют биологическое значение. Они образуются в ходе инфекций *in vivo* [58]. Предполагают, что они играют роль фактора, ограничивающего процесс вирусной инфекции. Показано также, что ДИ-частицы влияют на установление и поддержание персистентных вирусных инфекций в культуре ткани [59] и *in vivo* [70]. Наконец, высокие концентрации ДИ-частиц обнаруживаются в живых аттенуированных вакцинах [93], и, следовательно, они могут иметь значение для эффективности этих вакцин.

Описано большое число дефектных вирусов. Практически во всех препаратах вирусов животных присутствует очень много неинфекционных вирусных частиц. В некоторых случаях большая доля неинфекционных частиц может быть превращена в инфекционные [35] при помощи различных обработок, что свидетельствует об их потенциальной инфекционности. Часто природа дефекта, делающего эти частицы неинфекционными, неизвестна. Не исключено правда, что системы анализа, в которых эффективность бляшкообразования меньше 100%, неоптимальны.

Взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином

Кроме взаимодействий, происходящих между вирусами, при смешанной инфекции возможны также взаимодействия между вирусом и клеткой-хозяином. Многие из них наблюдаются в любой хозяйской клетке, но для некоторых необходимы клетки особого типа с определенным генотипом. Ниже кратко обсуждаются некоторые из этих взаимодействий вирус — клетка.

Трансформация

Некоторые вирусы с ДНК-геномом трансформируют клетки культур, некомпетентных в поддержании полного репликативного цикла вируса. В результате трансформации у клеток изменяются морфологические, биохимические и ростовые характеристики и часто появляется способность давать опухоли при введении в подходящее животное [154]. Трансформацию наблюдали для паповавирусов (SV40 и полиомы), папилломавирусов, некоторых адено- и герпесвирусов. Лучшее всего этот феномен изучен для SV40 [155]. Трансформация с помощью SV40 требует экспрессии вирусного гена А, что доказывается температурочувствительностью трансформации, вызванной определенными *tsA*-мутантами вируса [146, 147]. Ген А кодирует раннюю функцию(и) реплика-

тивного цикла вируса, однако роль продукта гена А в трансформации пока до конца не выяснена. Для трансформации с помощью SV40 требуются также клеточные функции. Хозяйские клетки могут быть перmissive для литического роста вируса, разрешая экспрессию всех вирусных генов, приводящую к образованию вируса и лизису клетки. Они могут быть также полностью неpermissive, допускающими только временную экспрессию некоторых вирусных генов; эти клетки выживают и могут быть трансформированы. Некоторые популяции хозяйских клеток, состоящие из permissive и неpermissive субпопуляций, называют полуперmissive. Блокирование репликации SV40 в неpermissive клетках снимается при слиянии трансформированных клеток с permissive клетками, что свидетельствует о существовании диффундирующего генного продукта хозяйской клетки, определяющего permissiveness для репликации SV40. В настоящее время основа permissiveness остается загадкой. Вместе с тем стабильная связь permissive или неpermissive фенотипа с определенными клеточными линиями указывает на генетическую основу этого фенотипа. Трансформация ДНК-содержащими вирусами подробно рассмотрена в обзоре [154].

РНК-геномные вирусы из группы ретровирусов также способны трансформировать клетки, причем механизм этой трансформации был предметом пристального интереса. У ретровирусов две функции — трансформация и репликация — не являются взаимоисключающими, поскольку многие трансформированные клетки способны также продуцировать вирус. Тем не менее ни репликация вируса не нужна для трансформации, ни трансформация не нужна для репликации [149]. Наиболее изученная группа ретровирусов — вирусы типа С — может быть разделена на две большие подгруппы саркомных и лейкозных вирусов. Трансформация под действием вирусов этих двух групп происходит с помощью разных механизмов. Саркомные вирусы — «острые» трансформирующие вирусы, вызывающие опухоли у животных после короткого латентного периода. Они содержат особый ген (*onc*), вызывающий трансформацию. Это доказано неспособностью *ts*-мутантов по этому гену трансформировать клетки при неpermissive температуре [88]. Сравнительный анализ структуры ряда онкогенов «острых» трансформирующих ретровирусов выявил присутствие около 20 генов *onc*, которые не родственны между собой, но близкородственны разным клеточным генам или генным семействам (см. обзор [157]). Считают, что эти вирусные онкогены представляют собой клеточные гены, захваченные вирусом, однако механизм этого захвата остается неясным. Вирусы лейкозов не содержат генов *onc* в геноме и трансформируют клетки только после длительного латентного периода. В общем вирусы, продуцируемые этими трансфор-

мированными клетками, не приобретают гена *onc*. Одна из современных моделей трансформации этими вирусами предполагает, что при интеграции провируса с клеточной ДНК (см. ниже) клеточный онкоген попадает под контроль промотора транскрипции, расположенного в провирусе [56].

В дополнение к описанным выше взаимодействиям между ретровирусными и клеточными геномами некоторые хозяева и клетки имеют специфическую способность к трансформации определенными штаммами ретровирусов, а также способность поддерживать репликацию этих штаммов. Одним из хорошо изученных примеров является локус FV-1 мышей, определяющий резистентность или чувствительность к некоторым мышинным вирусам лейкозов. Аллели локуса FV-1 наследуются простым менделевским образом [15]. Различные аспекты трансформации ретровирусами подробно рассмотрены в обзоре [167].

Интеграция

Геномы трансформирующих вирусов обычно интегрируют с геномом трансформируемой клетки. Среди ДНК-содержащих опухолеродных вирусов лучше других изучена интеграция SV40. В частности, показано, что ДНК SV40 ковалентно связана с ДНК клетки-хозяина. Количество интегрированной ДНК варьирует в пределах от <1 до >10 геномных эквивалентов на диплоидный хозяйский геном [7]. Трансформация может осуществляться при помощи субгеномных фрагментов SV40, и эти фрагменты также интегрируют с клеточной ДНК. Место интеграции непостоянно как для вирусного, так и для клеточного геномов [126]. Предложены два механизма интеграции: один из них — обычная рекомбинация между частично гомологичными вирусными и хозяйскими последовательностями, другой — незаконная рекомбинация между негомологичными участками. Имеющиеся данные позволяют отдать предпочтение второму механизму [155].

Геномы ретровирусов обнаруживаются в интегрированном провирусном состоянии в зараженных и трансформированных клетках. РНК-геном ретровирусов подвергается обратной транскрипции с образованием ДНК на начальном этапе репликативного цикла, после чего образованная ДНК (провирус) интегрирует с геномом клетки-хозяина. Механизм интеграции ретровирусов имеет три отличительные особенности [157]: а) место включения в хозяйскую хромосому неспецифично и не имеет гомологии с вирусными последовательностями, что указывает на интеграцию посредством незаконной рекомбинации; б) короткая нуклеотидная последовательность в участке интеграции дублируется, что приводит к образованию прямых повторов нескольких оснований ДНК хозяина, фланкирующих провирус; в) уча-

сток интеграции в вирусной ДНК строго детерминирован. Таким образом, интеграция ретровирусов происходит путем встраивания специфического сайта вирусной ДНК в неспецифический сайт клеточной ДНК. Такое поведение при интеграции, а также структура провируса, напоминающая структуру и интеграцию перемещающихся генетических элементов, обнаруживаемых у прокариот и эукариот, послужило основой для предположения о том, что ретровирусы произошли из этих подвижных элементов [150]. Недавно это предположение подтверждено наблюдением, согласно которому РНК-копии подвижного генетического элемента *copia* у *Drosophila* обнаруживаются в ретровирусоподобных частицах [134]. Способность ретровирусов захватывать клеточные гены и включать их в хозяйскую хромосому приводит к мысли о том, что, возможно, эти вирусы играют роль агентов, переносящих генетическую информацию наподобие трансдуцирующих фагов.

Персистентная инфекция

Персистентные инфекции обнаружены у широкого круга вирусов животных. Когда литический вирус устанавливает персистентную инфекцию в чувствительном хозяине, и на вирус, и на хозяина оказывается сильное селективное давление. Либо вирус должен измениться так, чтобы более не причинять вреда хозяину, либо клетки должны измениться так, чтобы стать способными поддерживать репликацию вируса без лизиса [3]. Значительное внимание было сфокусировано на первой возможности (см. обзоры [60, 173]) и при этом очень мало внимания уделялось второй. Из популяций персистентно инфицированных клеток выделяли «вылеченные» клетки. Эти клетки обычно были резистентными к повторной инфекции вирусом дикого типа [158]. Спонтанно возникающие резистентные варианты были также выделены из популяций незараженных чувствительных клеток [168]. Эти наблюдения указывают на то, что чувствительность к вирусной инфекции определяют клеточные гены и что мутации по этим генам возникают спонтанно и затем подвергаются отбору при персистентной инфекции. При тщательном изучении клеток, персистентно зараженных реовирусом, были получены доказательства, подтверждающие важную роль клеточных мутаций в персистентной инфекции [3]. В опытах на этих клетках были обнаружены «вылеченные» субкультуры некоторых клеточных линий, персистентно инфицированных реовирусом, которые не проявляли никаких признаков реовирусной инфекции. Эти «вылеченные» клеточные линии обладали равномерно сниженной способностью реплицировать реовирус дикого типа, тогда как вирус из персистентно инфицированных роди-

тельских клеток реплицировался в них нормально. Более того, когда эти клетки заражали вирусом дикого типа, значительное число клеток оказывалось снова персистентно инфицированным, что не характерно для заражения этим вирусом. Таким образом, и персистентно инфицированные клетки, и находящийся в них вирус, очевидно, коэволюционировали и дали варианты вируса и клеток, которые оказались лучше приспособленными к состоянию персистенции.

Картирование вирусных геномов

Генетическое картирование

Генетические карты, в которых вирусные мутации расположены в определенном линейном порядке с указанием относительных расстояний между ними, получают путем рекомбинационного анализа. Детали картирования для вирусов с внутримолекулярным механизмом рекомбинации и для вирусов с обменивающимися сегментами различаются.

Рекомбинационные карты

У вирусов, рекомбинирующих по внутримолекулярному механизму, вероятность рекомбинационного события между двумя маркерами обусловлена расстоянием между ними, и рекомбинационные частоты у соседних интервалов примерно аддитивны (см. выше). Таким образом, для определения частот рекомбинаций обычно используют двухфакторные скрещивания, а эти частоты затем используют для упорядочивания мутаций на карте (рис. 7.1). Аддитивность рекомбинационных частот очень близко или очень далеко расположенных маркеров нарушается, и поэтому их нельзя безошибочно поместить на карте. В этих случаях для разрешения неопределенности в положении маркеров можно применять трехфакторные скрещивания. Таким образом были составлены рекомбинационные карты для ДНК-содержащих вирусов [49, 127, 148] и пикорнавирусов [20]. Аддитивность рекомбинационных частот между мутантами вируса полиомиелита была одним из первых доказательств того, что РНК-геном пикорнавирусов рекомбинирует по внутримолекулярному механизму.

Карты обмена сегментами

Проблема картирования мутаций у вирусов с сегментированным геномом принципиально отличается от рассмотренной выше, поскольку маркеры, способные к рекомбинации, находятся в раз-

личных сегментах генома, между которыми не наблюдается никакого сцепления. Тем не менее даже в отсутствие сцепления были составлены приблизительные карты, на которых мутации расположены в конкретных сегментах генома. В этих картах нет взаимного расположения мутаций в пределах одного сегмента; в них лишь констатируется присутствие мутации в данном сегменте. Карты обмена сегментами составлены при помощи скрещиваний между мутантами различных штаммов и серотипов, для которых характерен полиморфизм электрофоретической подвижности сегментов генома. Это позволяет выяснить происхождение каждого сегмента генома рекомбинанта (см. выше). При анализе многих рекомбинантов фенотип дикого типа или мутанта коррелирует соответственно с отсутствием или наличием сегмента из мутантного родителя. Сегмент, распределяющийся в рекомбинантном потомстве неслучайным образом, несет мутацию (рис. 7.3, Б). Карты обмена сегментами были составлены для большого числа вирусов; они подтвердили, что мутации, способные рекомбинировать, расположены в различных сегментах генома [6, 111, 129].

Физические и биохимические карты

На генетической карте можно видеть относительное положение специфических мутаций в геноме, но она не дает никакой информации о генах (и генных продуктах, кодируемых в них), расположенных в соответствующих участках генома. Кроме того, некоторые РНК-содержащие вирусы не рекомбинируют со сколько-нибудь заметной частотой, так что их мутации не картируются. Для картирования мутаций, генов и генных продуктов на физических картах геномов разработан ряд методов. Эти методы, основанные скорее на биохимических, чем на генетических приемах, можно использовать для создания карт геномов без рекомбинации и без мутаций. Ниже рассматривается ряд методов физического и биохимического картирования.

Рестрикционные карты

Создание физических карт геномов ДНК-содержащих вирусов началось после того, как в практику вошли рестрикционные эндонуклеазы [23]. Эти ферменты расщепляют ДНК в определенных участках нуклеотидной последовательности, и сайты расщепления могут служить контрольными точками в геноме, расстояния между которыми известны. Стратегия рестрикционного картирования состоит в расщеплении хромосомной ДНК подходящим ферментом и последующем определении размера и порядка расположения образующихся фрагментов в хромосоме.

После этого контрольные точки, представляющие собой сайты расщепления на рестрикционной карте, можно использовать для картирования разнообразных молекулярных маркеров, например точки начала репликации ДНК [24] и кодирующих областей специфических мРНК [125]. Подробные рестрикционные карты с использованием довольно большого числа рестрикционных эндонуклеаз были составлены для всех ДНК-содержащих вирусов; эти карты оказались чрезвычайно ценными для молекулярных исследований этих вирусов. Рестрикционное картирование выявило многочисленные особенности организации геномов ДНК-содержащих вирусов: например, было показано, что у HSV геном устроен очень сложно: он характеризуется повторяющимися последовательностями и инверсией сегментов [161]. Рестрикционные карты ДНК-копий генов и целых геномов РНК-содержащих вирусов делают эти последовательности доступными для разнообразных манипуляций возможных на ДНК [106].

Физические карты

Знание рестрикционных карт ДНК-геномных вирусов позволило провести быстрое картирование многих генетических маркеров, особенно *ts*-мутаций, и выявить их физическое положение в хромосоме. Мутации выявляют на физической карте с помощью ряда методов, которые представляют собой варианты одной основной стратегии: спасение мутанта соответствующим рестрикционным фрагментом дикого типа. У SV40 получены частичные гетеродуплексы, содержащие одну цепь — индивидуальный рестрикционный фрагмент ДНК дикого типа, а другую — полноразмерную одноцепочечную ДНК *ts*-мутанта. Эти гетеродуплексные ДНК использовали для трансфекции клеток, после чего потомство анализировали на присутствие дикого типа. Спасение *ts*-мутаций осуществлялось только тем рестрикционным фрагментом, который перекрывал последовательность, содержащую мутацию, позволяя картировать последнюю между сайтами расщепления, расположенными на концах этого фрагмента [82]. У аденовирусов и герпесвирусов физические карты были составлены путем анализа *ts*⁺-потомства, полученного при межтиповом скрещивании *ts*-мутантов, имеющих различные рестрикционные карты (рис. 7.3, А). Были составлены рестрикционные карты *ts*⁺-рекомбинантного потомства, а совместное распределение определенных фрагментов с рекомбинантным фенотипом позволило поместить мутации в эти фрагменты [53, 95]. *ts*-Мутации картированы также при помощи варианта метода спасения маркера, в котором мутантные геномы смешивали с индивидуальными рестрикционными фрагментами дикого типа, и этой смесью трансфицировали клетки. Спасение маркера регистрировали при рекомбинации с

фрагментами дикого типа только в том случае, если эти фрагменты перекрывали место мутации [101]. Когда мутации нанесли и на генетические, и на физические карты, было отмечено хорошее соответствие этих карт.

При составлении физических карт с помощью рестрикционного анализа рекомбинантного потомства, полученного при межтиповом скрещивании, удобным маркером могут служить полиморфные белки. Косегрегация рестрикционного фрагмента со специфическим белковым маркером позволила локализовать на физической карте кодирующие последовательности многих белков [95]. Этим методом можно картировать специфические кодирующие последовательности белков без какой-либо информации о них, за исключением электрофоретической подвижности.

Транскрипционные карты

Составлены карты, показывающие участки генома, кодирующие специфические мРНК. Эти карты были получены в два этапа: а) сначала мРНК, кодируемые определенным участком вирусного генома, отбирали путем гибридизации с индивидуальным рестрикционным фрагментом ДНК; б) затем белки, кодируемые этой мРНК, идентифицировали при помощи трансляции *in vitro*. Таким образом можно идентифицировать специфические мРНК и белки, соответствующие последовательностям в индивидуальном рестрикционном фрагменте [85].

Транскрипционное картирование используют для определения порядка генов у тех РНК-содержащих вирусов, которые не рекомбинируют и поэтому не могут быть объектом стандартного генетического картирования. Методы, применяемые для этих вирусов, зависят от наличия единственного промотора, с которого начинается транскрипция полицистронной РНК, впоследствии разрезаемой на индивидуальные мРНК. Матрица транскрипции служит мишенью для внесения ультрафиолетовых повреждений, которые блокируют транскрипцию участка, расположенного за сайтом повреждения. Облученный УФ-светом вирус используют для заражения или транскрипции в бесклеточной системе, и затем определяют количество каждого транскрипта. Гены, расположенные дальше от промотора, представляют большую мишень, чем гены, расположенные ближе к промотору; благодаря этому остаточная транскрипционная активность каждого гена становится мерой расстояния от промотора. Картирование по транскрипционному размеру мишени использовали для определения порядка генов у вируса везикулярного стоматита [4] и вируса ньюкаслской болезни [17].

Трансляционные карты

Одна из первых карт генома вирусов животных была получена для вируса полиомиелита с использованием метода так называемого «пактамицинового картирования» [142, 144]. Картирование этим методом основано на том, что а) пактамицин подавляет инициацию белкового синтеза, но разрешает продолжаться синтезу уже иницированной белковой цепи и б) трансляция генома вируса полиомиелита начинается с одной точки и приводит к образованию гигантского полипептида-предшественника. Если к зараженным клеткам, активно синтезирующим вирусный белок, добавить пактамицин и изотопную метку, то метка будет включаться только в те белки, синтез которых начался еще до добавления ингибитора. Поскольку синтез белка осуществляется на РНК в направлении $5' \rightarrow 3'$, те белки, которые закодированы ближе к $3'$ -концу, будут содержать много метки, а те, которые закодированы ближе к $5'$ -концу, будут содержать очень мало метки, либо будут совсем немечеными. Таким образом, последовательности, кодирующие различные белки вируса полиомиелита, были упорядочены по отношению к $5'$ -концу вирусной хромосомы. Метод пактамицинового картирования применяли и к другим энтеровирусам.

Трансляционная карта получена еще для одного нереконбинирующего вируса — тогавируса Синдбис [45]. Это сделали, определяя чувствительность к ультрафиолету процесса трансляции двух полицистронных мРНК, синтезируемых вирусом. Размер мишени использовали для картирования белков по отношению к единственной точке инициации трансляции на каждой мРНК. Поскольку порядок двух полицистронных мРНК в геноме известен, был установлен также и порядок белков во всем геноме.

Наконец, трансляционные карты получены для вирусов с сегментированным двухцепочечным РНК-геномом, сегменты которого моноцистронны. Разработан метод выделения индивидуальных сегментов, их денатурации и трансляции *in vitro* [91], который позволил определить белки, кодируемые отдельными геномными сегментами.

Генная инженерия и генетика вирусов

Разработка новых приемов для манипуляции с нуклеиновыми кислотами, обычно называемых «генной инженерией», открыла новые возможности для генетических исследований вирусов животных. Эти приемы привели к выяснению наиболее фундаментальных характеристик структуры генома ряда вирусов и определению последовательности нуклеотидов. У некоторых вирусов была расшифрована только часть последовательности.

В свою очередь расшифровка последовательностей позволила обнаружить регуляторные сигналы для различных молекулярных событий жизненного цикла вируса и предсказать аминокислотную последовательность продуктов многих генов. Молекулярное клонирование ДНК-копий РНК-геномных вирусов позволило применять для изучения этих вирусов методы, разработанные для ДНК. Применение методов генной инженерии обещает быстрый прогресс в понимании многих генетических явлений на молекулярном уровне. Приводимые ниже примеры иллюстрируют эффективность этих методов.

Изучение экспрессии вирусных генов

Регуляция экспрессии вирусных генов уже давно была фундаментальным вопросом, вызывавшим большой интерес. Традиционный генетический подход встречает трудности при изучении регуляции в связи с редкостью регуляторных мутаций; возможно, это обусловлено тем, что структурные гены, находящиеся под контролем, имеют гораздо больший размер, чем последовательности, которые их регулируют. Кроме того, регуляторные мутации, используемые в стандартном генетическом анализе, обычно имеют фенотип «все или ничего», что не позволяет получить существенную информацию о модуляции экспрессии генов. Молекулярное клонирование вирусных структурных генов и их регуляторных элементов привело к идентификации элементов, участвующих в разнообразных регуляторных механизмах. Благодаря определению структуры клонированных генов, а также использованию векторов на основе вирусов животных удалось выявить структуру промоторов транскрипции (ТАТА-последовательность, или последовательность Хогнесса) и участки, модулирующие транскрипцию этих промоторов (энхансеры) [119]. Идентификация регуляторных участков сделала возможной манипуляцию с ними с целью понять механизм их действия. В дополнение к этому можно воздействовать на вирусные гены в составе экспрессирующих векторов и затем изучать влияние этих воздействий на функцию генного продукта [143].

Сайт-специфический мутагенез

Традиционно генетики были вынуждены работать с мутациями, расположение которых в геноме они не могли контролировать. Поэтому сайт-специфический мутагенез — один из приемов генной инженерии — представляет для них особый интерес. Описано множество методов сайт-специфического мутагенеза [16, 117, 135, 138]. Эти методы основаны на способности рестрикционных эндонуклеаз расщеплять ДНК по определенным последо-

вательностям. Эндонуклеазу подбирают таким образом, чтобы она расщепляла ДНК в том сайте (или рядом с тем сайтом), в котором требуется получить мутацию, причем ДНК обрабатывают в условиях, когда происходит разрыв лишь в одной цепи молекулы. Чтобы получить небольшой пробел в месте разрыва, используют экзонуклеазу, а затем ДНК либо обрабатывают мутагеном, специфичным к одноцепочечной ДНК, и заполняют пробел с помощью полимеразы, либо просто репарируют ДНК в условиях, когда в восстанавливаемую последовательность вносятся ошибки. Эту мутагенную методику использовали для исследования роли определенных нуклеотидов вблизи точки начала репликации ДНК SV40 [136, 137]. Она обещает быть полезной и в других вирусных системах.

Итоги и перспективы

Изложенный краткий обзор генетики вирусов животных был вынужденно выборочным и по рассмотренным темам, и по приведенным примерам. Закономерно, что рассмотрение началось и закончилось с понятия мутации, поскольку мутации представляют собой в конечном итоге главный источник того разнообразия, с которым имеет дело генетик. В остальных разделах главы обсуждены взаимодействия, происходящие между мутантными вирусами; благодаря некоторым из этих взаимодействий в вирусную популяцию вносится дополнительное разнообразие, приводящее к новым сочетаниям генетической информации. В нашем понимании генетики вирусов животных произошел заметный прогресс и все-таки каждый новый факт подчеркивает зачаточный уровень наших знаний.

Перспективы на будущее обнадеживают. Вероятно, со временем генетический анализ вирусов животных в еще большей степени будет направлен на выяснение механизмов, ответственных за определенные явления. Для решения поставленных вопросов будут применяться недавно разработанные методы. Разработка новых приемов будет способствовать развитию плодотворных исследований, и поэтому можно надеяться на значительный прогресс в данной области. Наконец, в книге, основной направленностью которой являются вирусные болезни человека, нелишне заметить, что генетический подход теперь начинают применять к вирусам, имеющим клиническое значение, а это обещает привести нас наконец к пониманию генетических и молекулярных основ вирусных заболеваний.

Литература

1. Abel P. (1962). Multiplicity reactivation and marker rescue with vaccinia virus, *Virology*, 17, 511—519

2. Ahmed R., Fields B. N. (1981). Reassortment of genome segments between reovirus defective interfering particles and infectious virus: Construction of temperature-sensitive and attenuated viruses by rescue of mutations from DI particles, *Virology*, **111**, 351—363.
3. Ahmed R., Canning W. M., Kauffman R. S., Sharpe A. H., Hallum J. V., Fields B. N. (1981). Role of the host cell in persistent viral infection: Coevolution of L cells and reovirus during persistent infection, *Cell*, **25**, 325—332.
4. Ball L. A., White C. N. (1976). Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 442—446.
5. Benjamin T. L. (1970). Host range mutants of polyoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 394—399.
6. Bishop D. H. L. (1978). Genetic potential of bunyavirus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **86**, 1—33.
7. Botchan M., McKenna G., Sharp P. A. (1974). Cleavage of integrated SV40 by RI restriction endonuclease, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 383—395.
8. Boursnell M. E. G., Mautner V. (1981). Recombination in adenovirus: Crossover sites in intertypic recombinants are located in regions of homology, *Virology*, **112**, 198—209.
9. Bratt M. A., Hightower L. E. (1977). Genetic and paragenetic phenomena in paramyxoviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 457—533, Plenum Press, New York.
10. Brockman W. W., Gutai M. W., Nathans D. (1975). Evolutionary variants of simian virus 40: Characterization of cloned complementing virus, *Virology*, **66**, 36—52.
11. Brown S. M., Ritchie D. A., Subak-Sharpe J. H. (1973). Genetic studies with herpes simplex virus type 1: The isolation of temperature-sensitive mutants their arrangement into complementation groups and recombination analysis leading to a linkage map, *J. Gen. Virol.*, **18**, 329—346.
12. Burge B. W., Pfeifferkorn E. R. (1966). Phenotypic mixing between group A arboviruses, *Nature (Lond.)*, **210**, 1397—1399.
13. Burnet F. M. (1960). *Principles of Animal Virology*, 2d ed., Academic Press, New York.
14. Chakraborty P. R., Ahmed R., Fields B. N. (1979). Genetics of reovirus: The relationship of interference to complementation and reassortment of temperature-sensitive mutants at nonpermissive temperature, *Virology*, **94**, 119—127.
15. Chen S., Lilly F. (1980). Genetic control of MuLV expression and spontaneous lymphoma in crosses of high- and low-lymphoma strains. In: *Animal Virus Genetics*, ed. by B. N. Fields, R. Jaenisch, and C. F. Fox, pp. 207—215, Academic Press, New York.
16. Chu T. S., Parris D. S., Dixon R. A. F., Farber F. E., Schaffer P. A. (1979). Hydroxylamine mutagenesis of HSV DNA and DNA fragments: Introduction of mutations into selected regions of the viral genome, *Virology*, **98**, 168—181.
17. Collins P. L., Hightower L. E., Ball L. A. (1980). Transcriptional map for Newcastle disease virus, *J. Virol.*, **35**, 682—693.
18. Cooper P. D. (1965). Rescue of one phenotype in mixed infections with heat-defective mutants of poliovirus type 1, *Virology*, **25**, 431—438.
19. Cooper P. D. (1969). The genetic analysis of poliovirus. In: *The Biochemistry of Viruses*, ed. by H. B. Levy, pp. 177—218, Marcel Dekker, New York.
20. Cooper P. D. (1977). Genetics of picornaviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 133—207, Plenum Press, New York.
21. Cross R. K., Fields B. N. (1976). Use of an aberrant polypeptide as a marker in three-factor crosses: Further evidence for independent reassortment as

- the mechanism of recombination between temperature-sensitive mutants of reovirus type 3, *Virology*, **74**, 345—362.
22. *Dahlberg J. E., Simon E. H.* (1969). Recombination in Newcastle disease virus (NDV): The problem of complementing heterozygotes, *Virology*, **38**, 490—493.
23. *Danna K. J., Nathans D.* (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2913—2917.
24. *Danna K. J., Nathans D.* (1972). Studies of SV40 DNA. IV. Bidirectional replication of simian virus 40 DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3097—3100.
25. *Davidson A. J., Wilkie N. M.* (1983). Either orientation of the L segment of the herpes simplex virus genome may participate in production of viable intertypic recombinants, *J. Gen. Virol.*, **64**, 247—250.
26. *Davidson A. J., Wilkie N. M.* (1983). Inversion of the two segments of the herpes simplex virus genome in intertypic recombinants, *J. Gen. Virol.*, **64**, 1—18.
27. *Domingo E., Sabo D., Taniguchi T., Weissman C.* (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population, *Cell*, **13**, 735—744.
28. *Drake J. W.* (1969). Mutagenic mechanisms, *Annu. Rev. Genet.*, **3**, 247—268.
29. *Drake J. W.* (1976). The biochemistry of mutagenesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 11—37.
30. *Dressler D., Potter H.* (1982). Molecular mechanisms in genetic recombination, *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 727—761.
31. *Dubbs D. R., Rachmeler M., Kit S.* (1974). Recombination between temperature-sensitive mutants of simian virus 40, *Virology*, **57**, 161—174.
32. *Dulbecco R.* (1952). Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **38**, 747—754.
33. *Dulbecco R., Vogt M.* (1954). Plaque formation and the isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, *J. Exp. Med.*, **99**, 167—182.
34. *Eckhart W.* (1977). Genetics of polyoma virus and simian virus 40. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 1—35, Plenum Press, New York.
35. *Estes M. K., Graham D. Y., Mason B. B.* (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity; molecular mechanisms, *J. Virol.*, **39**, 879—888.
36. *Fenner F.* (1958). The biological characters of several strains of vaccinia, cowpox and rabbitpox viruses, *Virology*, **5**, 502—529.
37. *Fenner F., McAuslan B. R., Mims C. A., Sambrook J., White D. O.* (1974). *The Biology of Animal Viruses*, 2d ed., p. 281, Academic Press, New York.
38. *Fields B. N.* (1971). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: Features of genetic recombination, *Virology*, **46**, 142—148.
39. *Fields B. N.* (1981). Genetics of reovirus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **91**, 1—24.
40. *Fields S., Winter G.* (1982). Nucleotide sequence of influenza virus segments 1 and 3 reveal mosaic structure of a small viral RNA segment, *Cell*, **28**, 303—313.
41. *Fields B. N., Weiner H. L., Drayna D. T., Sharpe A. H., Hrdy D., Rubin D., Bursin S., Ahmed R., Gentsch J., Donis-Keller H.* (1980). The molecular basis of reovirus virulence. In: *Animal Virus Genetics*, ed. by B. N. Fields, R. Jaenisch, and C. F. Fox, pp. 663—672, Academic Press, New York.
42. *Fincham R. S.* (1966). Genetic Coomplementation, W. A. Benjamin, New York.
43. *Fox M. S.* (1978). Some features of genetic recombination in procaryotes, *Annu. Rev. Genet.*, **12**, 47—68.
44. *Freese E.* (1963). Molecular mechanisms of mutations. In: *Molecular Genetics*, Vol. 1, ed. by J. H. Taylor, p. 207, Academic Press, New York.

45. Fuller F. J., Marcus P. I. (1980). Sindbis virus. I. Gene order of translation in vivo, *Virology*, **107**, 441—451.
46. Gesteland R. F., Wills N., Lewis J. B., Grodzicker T. (1977). Identification of amber and ochre mutants of the human virus Ad2+NDI, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4567—4571.
47. Ghendon Y., Markushi S., Lisovoskaya K., Penn C. R., Mahy B. W. (1982). Extragenic suppression of *ts* phenotype during recombination between *ts* mutants of two fowl plague virus strains with a *ts* mutation in gene 1, *J. Gen. Virol.*, **62**, 239—248.
48. Ginsberg H. S., Young C. S. H. (1976). Genetics of adenoviruses, *Adv. Cancer Res.*, **23**, 91—130.
49. Ginsberg H. S., Young C. S. H. (1977). Genetics of adenoviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 27—88, Plenum Press, New York.
50. Gorini L. (1970). Informational suppression, *Annu. Rev. Genet.*, **4**, 107—134.
51. Gorini L., Beckwith J. (1966). Suppression, *Annu. Rev. Microbiol.*, **20**, 401—422.
52. Granoff A. (1961). Induction of Newcastle disease virus mutants with nitrous acid, *Virology*, **13**, 402—408.
53. Grodzicker T., Williams J., Sharp P., Sambrook J. (1974). Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 439—446.
54. Hall J. D., Almy R. E. (1982). Evidence for control of herpes simplex virus mutagenesis by the viral DNA polymerase, *Virology*, **116**, 535—543.
55. Hartman P. E., Roth J. R. (1973). Mechanisms of suppression, *Adv. Genet.*, **17**, 1—105.
56. Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M. (1981). Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis, *Nature (Lond.)*, **290**, 475—480.
57. Holland J. J., Cords C. E. (1964). Maturation of poliovirus RNA with capsid protein coded by heterologous enteroviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 1082—1085.
58. Holland J. J., Villareal L. P. (1975). Purification of defective interfering T particles of vesicular stomatitis and rabies viruses generated in vivo in the brains of newborn mice, *Virology*, **67**, 438—449.
59. Holland J. J., Grabau E., Jones C. L., Semler B. L. (1979). Evolution of multiple genome mutations during long term persistent infection with vesicular stomatitis virus, *Cell*, **16**, 495—504.
60. Holland J. J., Kennedy S. I., Semler B. L., Jones L., Roux L., Grabau E. (1980). Defective interfering RNA viruses and the host cell response. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 16, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 137—192, Plenum Press, New York.
61. Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., Van de Pol S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes, *Science*, **215**, 1577—1585.
62. Honess R. W., Roizman B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins, *J. Virol.*, **14**, 8—19.
63. Honess R. W., Buchman A., Halliburton I. W., Watson D. H. (1980). Recombination and linkage between structural and regulatory genes of herpes simplex virus type 1: Study of the functional organization of the genome, *J. Virol.*, **34**, 716—742.
64. Hosaka Y., Kitano H., Ikeguchi S. (1966). Studies on the pleomorphism of HVJ virions, *Virology*, **29**, 205—221.
65. Huang A. S., Baltimore D. (1977). Defective interfering animal viruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 10, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 73—116, Plenum Press, New York.
66. Huang A. S., Wagner R. R. (1966). Comparative sedimentation coefficients

- of RNA extracted from plaque-forming and defective particles of vesicular stomatitis virus, *J. Mol. Biol.*, **22**, 381—384.
67. Huang A. S., Palma E. L., Hewlett N., Roizman B. (1974). Pseudotype formation between enveloped RNA and DNA viruses, *Nature (Lond.)*, **252**, 743—745.
 68. Huismans H., Joklik W. K. (1976). Reovirus-coded polypeptides in infected cells: Isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, *Virology*, **70**, 411—424.
 69. Itoh H., Melnick J. L. (1959). Double infections of single cells with ECHO 7 and Cocksackie A9 viruses, *J. Exp. Med.*, **109**, 393—406.
 70. Jones C. L., Holland J. J. (1980). Requirements for DI particle prophylaxis against VSV infection in vivo, *J. Gen. Virol.*, **49**, 215—220.
 71. Jones N., Shenk T. (1978). Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5, *Cell*, **13**, 181—188.
 72. Keller J. M., Spear P. G., Roizman B. (1970). Proteins specified by herpes simplex virus. III. Viruses differing in their effects on the social behavior of infected cells specify different membrane glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 865—871.
 73. Kelly T. J., Nathans D. (1977). The genome of simian virus 40, *Adv. Virus Res.*, **21**, 85—120.
 74. Keranen S. (1977). Interference of wild type virus replication by an RNA negative temperature sensitive mutant of Semliki Forest virus, *Virology*, **80**, 1—11.
 75. King A. M., McCahon D., Slade W. R., Neuman J. W. I. (1982). Recombination in RNA, *Cell*, **29**, 921—928.
 76. King A. M., Slade W. R., Neuman J. W. I., McCahon D. (1980). Temperature sensitive mutants of foot-and-mouth disease virus with altered structural polypeptides. II. Comparison of recombination and biochemical maps, *J. Virol.*, **34**, 67—72.
 77. Kingsbury D. W., Granoff A. (1970). Studies on mixed infection with Newcastle disease virus. IV. On the structure of heterozygotes, *Virology*, **42**, 262—265.
 78. Kjellen L. E. (1963). A variant of adenovirus type 5, *Arch. Ges. Virusforsch.*, **13**, 482—488.
 79. Knipe D. M., Ruyechen W. T., Honess R. W., Roizman B. (1979). Molecular genetics of herpes simplex virus: The terminal *a* sequences of the L and S components are obligatorily identical and constitute a part of a structural gene mapping predominantly in the S component, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4534—4538.
 80. Knipe D. M., Ruyechen W. T., Roizman B., Halliburton I. W. (1978). Molecular genetics of herpes simplex virus: Demonstration of regions of obligatory and nonobligatory identity within diploid regions of the genome by sequence replacement and insertion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3896—3900.
 81. Lai C.-J., Nathans D. (1974). Mapping the genes of simian virus 40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 53—60.
 82. Lai C.-J., Nathans D. (1974). Mapping temperature sensitive mutants of SV40: Rescue of mutants by fragment of DNA, *Virology*, **60**, 466—475.
 83. Lazzarini R. A., Keene J. D., Schubert M. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative strand RNA viruses, *Cell*, **26**, 145—154.
 84. Ledinko N., Hirts G. K. (1961). Mixed infection of cells with poliovirus types 1 and 2, *Virology*, **14**, 207—219.
 85. Lewis J. B., Atkins J. F., Anderson C. W., Baum P. R., Gesteland R. F. (1975). Mapping of late adenovirus genes by cell free translation of RNA selected by hybridization to specific DNA fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1344—1348.
 86. Li J. K. K., Keene J. D., Scheible P. P., Joklik W. K. (1980). Nature of the

- 3'-terminal sequences of the plus and minus strands of the S1 gene of reovirus serotypes 1, 2 and 3. *Virology*, **105**, 41—51.
87. *Linial M., Blair D.* (1982). Genetics of retroviruses. In: *RNA Tumor Viruses*, ed. by R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin, pp. 649—784, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 88. *Martin G. S.* (1970). Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state, *Nature* (Lond.), **227**, 1021—1023.
 89. *Massicot J. G., VanWyke K., Chanock R. M., Murphy B. R.* (1982). Evidence for intrasegmental complementation between two influenza A viruses having *ts* mutants in their P1 genes, *Virology*, **117**, 496—500.
 90. *McClain M. E., Spendlove R. S.* (1966). Multiplicity reactivation of reovirus particles after exposure to ultraviolet light, *J. Bacteriol.*, **92**, 1422—1429.
 91. *McCrae M. A., Joklik W. K.* (1978). The nature of the polypeptide encoded by each of the ten double-stranded RNA segments of reovirus type 3, *Virology*, **89**, 578—593.
 92. *McFadden G., Essani K., Dales S.* (1980). A new endonuclease restriction site which is at the locus of a temperature sensitive mutation in vaccinia virus is associated with true and pseudoreversion, *Virology*, **101**, 277—280.
 93. *McLaren L. C., Holland J. J.* (1974). Defective interfering particles from poliovirus vaccine and vaccine reference strains, *Virology*, **60**, 579—583.
 94. *Meselson M., Weigle J. J.* (1961). Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 857—868.
 95. *Morse L. S., Buchman T. G., Roizman B., Schaffer P. A.* (1977). Anatomy of herpes simplex virus DNA. IX. Apparent exclusion of some parental arrangements in the generation of intertypic (HSV-1×HSV-2) recombinants, *J. Virol.*, **24**, 231—248.
 96. *Moss B. A., Brownlee G. G.* (1981). Sequence of DNA complementary to a small RNA segment of influenza virus A/Nt/60/68, *Nucl. Acids Res.*, **9**, 1941—1947.
 97. *Murphy B. R., Tolpin M. D., Massicot J. G., Kim H. Y., Parrott R. H., Chanock R. M.* (1980). Escape of a highly defective influenza A virus mutant from its temperature sensitive phenotype by extragenic suppression and other types of mutation, *Ann. NY Acad. Sci.*, **354**, 172—182.
 98. *O'Connor G. T., Rabson A. S., Berezsky I. K., Paul P. J.* (1963). Mixed infection with simian virus 40 and adenovirus 12, *J. Natl. Cancer Inst.*, **31**, 903—915.
 99. *Palese P.* (1977). The genes of influenza virus, *Cell*, **10**, 1—10.
 100. *Palese P., Schulman J. L.* (1974). Mapping of the influenza virus genome: Identification of the hemagglutinin and the neuraminidase genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2142—2146.
 101. *Parris D. H., Dixon R. A. F., Schaffer P. A.* (1980). Physical mapping of herpes simplex virus type 1 *ts* mutants by marker rescue: Correlation of the physical and genetic maps, *Virology*, **100**, 275—287.
 102. *Patch C. T., Levine A. S., Lewis A. M.* (1979). The adenovirus-SV40 hybrid viruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 13, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 459—487, Plenum Press, New York.
 103. *Pfefferkorn E. R.* (1977). Genetics of togaviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 209—238, Plenum Press, New York.
 104. *Pringle C. R.* (1975). Conditional-lethal mutants of vesicular stomatitis virus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **69**, 85—116.
 105. *Pringle C. R.* (1977). Genetics of rhabdoviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 239—289, Plenum Press, New York.
 106. *Racaniello V. R., Baltimore D.* (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA

- and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4887—4891.
107. *Radding C. M.* (1978). Genetic recombination: Strand transfer and mismatch repair, *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 847—880.
 108. *Ramig R. F.* (1980). Suppression of temperature-sensitive phenotype in reovirus: An alternative pathway from *ts* to *ts*⁺ phenotype. In: *Animal Virus Genetics*, ed. by B. N. Fields, R. Jaenisch, and C. F. Fox, pp. 633—642, Academic Press, New York.
 109. *Ramig R. F., Fields B. N.* (1977). Method for rapidly screening revertants of temperature sensitive mutants for extragenic suppression, *Virology*, **81**, 170—173.
 110. *Ramig R. F., Fields B. N.* (1979). Revertants of temperature sensitive mutants of reovirus: Evidence for frequent extragenic suppression, *Virology*, **92**, 155—167.
 111. *Ramig R. F., Fields B. N.* (1983). Genetics of the reoviruses. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 197—228, Plenum Press, New York.
 112. *Ramig R. F., Ahmed R., Fields B. N.* (1983). A genetic map of reovirus: Assignment of the newly defined mutant groups H, I and J to genome segments, *Virology*, **125**, 299—313.
 113. *Ramig R. F., Cross R. K., Fields B. N.* (1977). Genome RNAs and polypeptides of reovirus serotypes 1, 2 and 3, *J. Virol.*, **22**, 726—733.
 114. *Ramig R. F., White R. M., Fields B. N.* (1977). Suppression of the temperature sensitive phenotype of a mutant of reovirus type 3, *Science*, **195**, 406—407.
 115. *Rapp F., Butel J. S., Melnick J. L.* (1965). SV40-adenovirus hybrid populations: Transfer of SV40 determinants from one type of adenovirus to another, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 717—724.
 116. *Ray U., Fields B. N.* (1979). Mutagenic specificity in reovirus, *J. Virol.*, **30**, 913—916.
 117. *Razin A., Hirose T., Itakura K., Riggs A. D.* (1978). Efficient correction of a mutation by use of chemically synthesized DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4268—4270.
 118. *Rekosh D.* (1972). Gene order of poliovirus capsid proteins, *J. Virol.*, **9**, 479—487.
 119. *Rigby P. W. J.* (1983). Cloning vectors derived from animal viruses, *J. Gen. Virol.*, **64**, 255—266.
 120. *Roizman B.* (1962). Polykaryosis: Results from fusion of mononucleated cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 327—342.
 121. *Roizman B.* (1979). The organization of the herpes simplex virus genomes, *Annu. Rev. Genet.*, **13**, 25—57.
 122. *Roizman B.* (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes, *Cell*, **16**, 481—494.
 123. *Roth J. R.* (1974). Frameshift mutations, *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 319—346.
 124. *Sambrook J. F., Padgett B. L., Tomkins J. K. N.* (1966). Conditional lethal mutants of rabbitpox virus: I. Isolation of host cell dependent and temperature dependent mutants, *Virology*, **28**, 592—599.
 125. *Sambrook J., Sugden B., Keller W., Sharp P. A.* (1973). Transcription of simian virus 40. III. Mapping of "early" and "late" species of RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3711—3715.
 126. *Sambrook J., Greene R., Stringer J., Mitchison T., Hu S. L., Botchan M.* (1979). Analysis of the sites of integration of viral DNA sequences in rat cells transformed by adenovirus 2 or SV40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 569—576.
 127. *Schaffer P. A.* (1975). Temperature sensitive mutants of herpesviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **70**, 51—100.
 128. *Schaffer P. A., Tevethia M. J., Benyesh-Melnick M.* (1974). Recombination

- between temperature sensitive mutants of herpes simplex type 1, *Virology*, **58**, 219—228.
129. Scholtissek C. (1979). Influenza virus genetics, *Adv. Genet.*, **20**, 1—36.
 130. Scholtissek C., Spring S. B. (1982). Extragenic suppression of temperature sensitive mutations in RNA segment 8 by replacement of different RNA segments with those of other influenza A virus prototype strains, *Virology*, **118**, 28—34.
 131. Sharp D. G. (1968). Multiplicity reactivation of animal viruses, *Proc. Med. Virol.*, **10**, 64—109.
 132. Sharpe A. H., Fields B. N. (1983). Pathogenesis of reovirus infection. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 229—285, Plenum Press, New York.
 133. Sheldrick P., Berthelot N. (1974). Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 667—678.
 134. Shiba T., Saigo K. (1983). Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*, *Nature (Lond.)*, **302**, 119—124.
 135. Shortle D., Nathans D. (1978). Local mutagenesis: A method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2170—2174.
 136. Shortle D., Nathans D. (1979). Regulatory mutants of simian virus 40: Constructed mutants with base substitutions at the origin of DNA replication, *J. Mol. Biol.*, **131**, 801—817.
 137. Shortle D., Margolskee R., Nathans D. (1979). Mutational analysis of the simian virus 40 replicon: Pseudorevertants of mutants with a defective replication origin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6128—6131.
 138. Shortle D., Grisafi P., Benkovic S. J., Botstein D. (1982) Gap misrepair mutagenesis: Efficient site-directed induction of transition, transversion and frameshift mutations in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1588—1592.
 139. Simpson R. W., Hirst G. K. (1961). Genetic recombination among influenza viruses. I. Cross reactivation of the plaque forming capacity as a method for selecting recombinants from the progeny of crosses between influenza A strains, *Virology*, **15**, 436—451.
 140. Stahl F. W. (1979). *Genetic Recombination: Thinking About It in Phage and Fungi*, W. H. Freeman, San Francisco.
 141. Subak-Sharpe J. H., Timbury M. C. (1977). Genetics of herpesviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 89—131, Plenum Press, New York.
 142. Summers D. F., Maizel J. V. (1971). Determination of the gene sequence of poliovirus with pactamycin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2852—2856.
 143. Sveda M. M., Markoff L. J., Lai C.-J. (1982). Cell surface expression of the influenza virus hemagglutinin requires the hydrophobic carboxy-terminal sequences, *Cell*, **30**, 649—656.
 144. Taber R., Rekosh D. M., Baltimore D. (1971). Effect of pactamycin on synthesis of poliovirus proteins: A method for genetic mapping, *J. Virol.*, **8**, 395—401.
 145. Takahashi M. (1972). Isolation of conditional lethal mutants (temperature sensitive and host dependent mutations) of adenovirus type 5, *Virology*, **49**, 815—817.
 146. Takemoto K. K., Martin M. A. (1970). SV40 thermosensitive mutants: Synthesis of viral DNA and virus induced proteins at nonpermissive temperature, *Virology*, **42**, 938—945.
 147. Tegtmeyer P. (1975). Function of simian virus 40 gene A in transforming infection, *J. Virol.*, **15**, 613—618.
 148. Tegtmeyer P. (1980). Genetics of SV40 and polyoma virus. In: *DNA Tumor Viruses*, ed. by J. Tooze, pp. 297—338, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

149. *Temin H. M.* (1963). Separation of morphological conversion and virus production in Rous sarcoma virus infection, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **27**, 407—414.
150. *Temin H. M.* (1980). Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements, *Cell*, **21**, 599—600.
151. *Temin H. M., Rubin H.* (1958). Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture, *Virology*, **6**, 669—688.
152. *Tolpin M. D., Clements M. L., Levine M. M., Black R. E., Saah A. J., Anthony W. C., Cisneros L., Chanock R. M., Murphy B. R.* (1982). Evaluation of a phenotypic revertant of the A/Alaska/77-*ts*-1A2 reassortment virus in hamsters and in seronegative adult volunteers: Further evidence that the temperature sensitive phenotype is responsible for attenuation of *ts*-1A2 reassortant viruses, *Infect. Immun.*, **36**, 645—650.
153. *Tolskaya E. A., Romanova L. A., Kolesnikova M. S., Agol V. I.* (1983). Intertypic recombination in poliovirus: Genetic and biochemical studies, *Virology*, **124**, 121—132.
154. *Tooze J.*, ed. (1980). DNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
155. *Topp W. C., Lane D., Pollack R.* (1980). Transformation by SV40 and polyoma viruses. In: DNA Tumor Viruses, ed. by J. Tooze, pp. 205—296, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
156. *Trautman R., Suttmoller P.* (1971). Detection and properties of a genomic masked viral particle consisting of foot-and-mouth disease virus nucleic acid in bovine enterovirus protein capsid, *Virology*, **44**, 537—543.
157. *Varmus H. E.* (1982). Form and function of retroviral proviruses, *Science*, **216**, 812—820.
158. *Vogt M., Dulbecco R.* (1958). Properties of HeLa cell culture with increased resistance to poliomyelitis virus, *Virology*, **5**, 425—434.
159. *Vogt P. K.* (1977). Genetic of RNA tumor viruses. In: Comprehensive Virology, Vol. 9, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 341—455, Plenum Press, New York.
160. *VonMagnus P.* (1954). Incomplete forms of influenza virus, *Adv. Virus Res.*, **2**, 59—86.
161. *Wadsworth S., Jacob R. J., Roizman B.* (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition and arrangement of inverted terminal repetitions, *J. Virol.*, **15**, 1487—1497.
162. *Wake C. T., Wilson J. H.* (1980). Defined oligomeric SV40 DNA: A sensitive probe of general recombination in somatic cells, *Cell*, **21**, 141—148.
163. *Walen K. H.* (1963). Demonstration of inapparent heterogeneity in a population of an animal virus by single burst analysis, *Virology*, **20**, 230—234.
164. *Webster R. G., Laver W. G., Air G. M., Schild G. C.* (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses, *Nature (Lond.)*, **296**, 115—121.
165. *Weiner H. L., Ramig R. F., Mustoe T. A., Fields B. N.* (1978). Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus, *Virology*, **86**, 581—584.
166. *Weiss R. A., Mason W. S., Vogt P. K.* (1973). Genetic recombinants and heterozygotes derived from endogenous and exogenous avian RNA tumor viruses, *Virology*, **52**, 535—552.
167. *Weiss R., Teich N., Varmus H., Coffin J.*, eds. (1982). RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
168. *Wilson J. H., DePamphilis M., Berg P.* (1976). Simian virus 40 permissive cell interactions: Selection and characterization of spontaneously arising monkey cells that are resistant to simian virus 40 infection, *J. Virol.*, **20**, 391—399.
169. *Wolgemuth D. J., Hsu M. T.* (1980). Visualization of genetic recombination

- intermediates of human adenovirus type 2 DNA from infected HeLa cells, *Nature (Lond.)*, **287**, 168—170.
170. *Yamamoto T., Shimojo H.* (1971). Multiplicity reactivation of human adenovirus type 12 and simian virus 40 irradiated by ultraviolet light, *Virology*, **45**, 529—531.
 171. *Yoshiike K.* (1968). Studies on DNA from low density particles of SV40. I. Heterogeneous defective virions produced by successive undiluted passage, *Virology*, **34**, 391—401.
 172. *Young C. S. H., Silverstein S. J.* (1980). The kinetics of adenovirus recombination in homotypic and heterotypic genetic crosses, *Virology*, **101**, 503—515.
 173. *Youngner J. S., Preble O. T.* (1980). Viral persistence: Evolution of viral populations. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 16, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 73—155, Plenum Press, New York.
 174. *Youngner J. S., Quagliani D. O.* (1978). Temperature sensitive mutants of VSV are conditionally defective particles that interfere with and are rescued by wild type virus, *J. Virol.*, **19**, 102—107.
 175. *Zavada J.* (1972). Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukemia and avian myeloblastosis viruses, *J. Gen. Virol.*, **15**, 183—191.
 176. *Zavada J., Rosenburgova M.* (1972). Phenotypic mixing of vesicular stomatitis virus with fowl plague virus, *Acta Virol.*, **16**, 103—114.

Молекулярная генетика вирусов животных

Дэвид М. Найп¹

Генетические взаимодействия между вирусами эукариот и между вирусами и хозяйскими клетками описаны в гл. 7. По мере того как повышался уровень изучения генетики многих вирусов, в большей части работ стали проводить глубокий анализ геномов с использованием специальных воздействий на геномы, во многих случаях при помощи мутагенеза *in vitro* и перестройки структуры ДНК. Эта возможность появилась благодаря успехам, достигнутым в технологии рекомбинантных ДНК, которые сыграли большую роль в генетических исследованиях как ДНК-содержащих, так и РНК-содержащих вирусов. Недавнее сообщение о системе рекомбинантной РНК для амплификации молекул РНК [80] может направить генетику и тех, и других вирусов в еще одном перспективном направлении.

В настоящей главе рассматривается, как эти новые методы могут быть или уже были применены для изучения вирусных геномов. Поскольку конечная цель наших исследований заключается в понимании генетики и биологии вирусов, а также механизма их взаимодействия с клетками хозяев, мы будем опираться на некоторые работы, освещающие основы биологии вирусов.

Клонирование рекомбинантных структур вирусных ДНК

Возможность размножать и нарабатывать вирусные геномы в виде молекул рекомбинантных ДНК предоставляет специалистам по молекулярной биологии вирусов следующие преимущества. а) ДНК-геномы вирусов, которые трудно или невозможно выращивать в культуре (таких как вирус гепатита В или вирус папилломы), могут быть получены в больших количествах в виде

¹ David M. Knipe, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115.

рекомбинантных молекул. б) Субгеномные фрагменты ДНК, которые трудно выделить из суммарного генома, расщепленного рестрикционными эндонуклеазами, могут быть получены в гарантированно чистом виде путем клонирования. в) Молекулы редких вирусных ДНК, такие как провирусы ретровирусов, могут быть получены в больших количествах. г) Могут быть получены и клонированы ДНК-копии геномов РНК-содержащих вирусов. д) Все эти молекулы служат отличными объектами для быстрого секвенирования и мутагенеза *in vitro*.

Процедуры, применяемые для молекулярного клонирования ДНК, подробно описаны в работе [70]. Небольшие кольцевые геномные молекулы ДНК можно клонировать путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой, делающей один разрыв во всей молекуле, и лигирования с обработанной сходным образом молекулой плазмидной ДНК [92, 96]. Рекомбинантные молекулы ДНК вводят в *Escherichia coli* при помощи стандартной процедуры [70]. Линейные двухцепочечные молекулы вирусной ДНК клонируют в виде субгеномных фрагментов ДНК. Расщепление линейной геномной молекулы ДНК при помощи большинства рестрикционных эндонуклеаз дает как внутренние, так и концевые фрагменты. Внутренние фрагменты могут быть клонированы путем прямого лигирования с расщепленной плазмидной или фаговой ДНК, как описано выше. Концевые фрагменты не содержат сайта для клонирования на одном конце. Для того чтобы обойти эту трудность, к концу молекулы вирусной ДНК пришивают синтетический фрагмент, содержащий участок расщепления рестрикционной эндонуклеазой (линкерную молекулу) [83], или до клонирования на одном конце достраивают гомополимерную последовательность ДНК при помощи концевой трансферазы [128].

ДНК-копии геномов РНК-содержащих вирусов и мРНК синтезируют при помощи обратной транскриптазы, а синтез второй цепи ДНК — при помощи ДНК-полимеразы *E. coli*. Концы комплементарной ДНК (кДНК) достраивают гомополимерными «хвостами», и лигируют ее с плазмидной ДНК, также имеющей гомополимерные «хвосты» [70].

Редкие молекулы вирусной ДНК, например интегрированные с геномом хозяина или ДНК провируса ретровирусов, обычно клонируют, лигируя тотальную клеточную ДНК с ДНК фага λ и затем упаковывая ДНК *in vitro*. Полученные вирусы подвергают скринингу при помощи гибридизации *in situ* с негативными колониями вируса [5]. При получении и анализе большого количества рекомбинантных молекул ДНК фаги эффективнее плазмидных векторов. После получения молекулы ДНК требующегося рекомбинантного фага вирусную вставку ДНК часто переносят в плазмидный вектор для дальнейшего использования.

Все шире используют векторы на основе фага M13 [78, 79]. Простота очистки вирионов, содержащих одноцепочечную ДНК, делает их удобным источником чистой одноцепочечной ДНК для мутагенеза (см. ниже), S1-нуклеазного анализа [84] и секвенирования ДНК по методу обрыва цепи с использованием дидезоксинуклеотидов [115].

Быстрые методы секвенирования ДНК [72, 115] позволили определить полные нуклеотидные последовательности нескольких вирусных ДНК-геномов: SV40 [21, 102], вируса полиомы [124], вируса гепатита В [22], вируса папилломы крупного рогатого скота [12], вируса папилломы человека [117], паповавируса человека [142] и вируса Эпштейна — Барр (EBV) [20]. Секвенированы клонированные ДНК-копии геномов РНК-содержащих вирусов, для которых после сопоставления получена полная последовательность генома таких вирусов, как вирус полиомиелита [58, 99] и вирус везикулярного стоматита (VSV) [23, 108, 111]. Расшифрованы клонированные ДНК ретровирусов [101, 119].

Экспрессия вирусных ДНК в *Escherichia coli*

Многие продукты вирусных генов экспрессируются в зараженных или трансформированных вирусами клетках на таком низком уровне, что их очень трудно или даже невозможно очистить для исследования функции или приготовления специфических антител. В преодолении этой трудности большую роль сыграла технология получения рекомбинантных ДНК, которая позволила повысить экспрессию некоторых участков ДНК в *E. coli*.

Для экспрессии вирусных ДНК в *E. coli* используют два общих подхода: 1) конструирование гибридных генов, состоящих из прокариотических генов, обычно генов β -галактозидазы (*lacZ*) или β -лактамазы, и генов, кодирующих последовательности вирусных ДНК, и 2) соединение вирусного гена с прокариотической регуляторной нуклеотидной последовательностью. В первом случае экспрессируется гибридный белок, а во втором образуется аутентичный вирусный белок.

Исходно гибридные гены, включающие нуклеотидные последовательности вирусных генов, создавали при помощи рекомбинации *in vitro*, используя рестрикционные эндонуклеазы, расщепляющие вирусный геном в сайтах определенных последовательностей. Образование непрерывной рамки считывания при лигировании вирусных и плазмидных последовательностей может быть предсказано. Недавно разработаны векторы для экспрессии в *E. coli*, позволяющие проводить отбор и включение произвольной чужеродной ДНК, которая экспрессируется с использованием бактериальных сигналов. Они названы векторами с от-

крытой рамкой считывания (orf, от англ. open reading frame) [38]. Вектор состоит из плазмиды, которая содержит нефункциональный ген *lacZ*. Этот ген инактивировали при помощи вставки линкерного олигонуклеотида в его начальный участок, что приводит к сдвигу рамки. В линкерный участок по специфическим местам могут быть встроены произвольные фрагменты ДНК. После этого ДНК вводят в *E. coli* при помощи трансформации. Включение фрагментов ДНК, имеющих непрерывную рамку считывания, может привести к восстановлению исходной рамки считывания и дать функционально активный ген *lacZ*. Трансформанты *lac*⁺ отбирают на индикаторных средах.

В векторе orf была экспрессирована часть одного из ядерных антигенов вируса Эпштейна — Барр (EBNA) [49]. Вирус Эпштейна — Барр не удается клонировать при помощи метода бляшек, и поэтому классический генетический подход для него неприменим. Антиген EBNA экспрессируется в иммортализованных вирусом лимфоцитах человека, и возможно играет важную роль в иммортализации. Однако белки EBNA трудно идентифицировать и очистить. Идентифицированы фрагменты ДНК, экспрессирующиеся в иммортализованных лимфоцитах [48, 50, 132]. Один из них введен в вектор orf, в результате чего получены *lac*⁺-трансформанты [49]. Гибридный белок β -галактозидаза — EBNA идентифицирован по реакции с анти- β -галактозидазной и человеческой EBNA-позитивной сыворотками. Для того чтобы приготовить антисыворотку, специфичную к этому вирусному антигену, β -галактозидазный гибридный белок очищали и вводили кроликам. Антисыворотки осаждали из лимфоцитов, трансформированных EBV, белок с мол. массой 78—85·10³. Осаждаемый антиген оказался эквивалентным одному из антигенов EBNA, называемому EBNA-1. Проведенные исследования позволили установить рамку считывания для антигена EBNA-1 и получить антительную пробу на этот белок. Это свидетельствует об эффективности данного подхода при изучении сложной генетики EBV.

Специфические вирусные белки предпочтительно экспрессировать в виде аутентичных вирусных белков, а не в форме гибридов. Поэтому альтернативой к описанному выше подходу служит помещение транскрипционных и трансляционных сигналов *E. coli* рядом с вирусным геном таким образом, чтобы трансляция начиналась с собственного ATG-кодона вирусного гена. Необходимыми бактериальными регуляторными элементами являются промотор транскрипции и участок связывания с рибосомой, состоящий из последовательности Шайна — Дальгарно и иницирующего кодона [106]. Для этого используют промоторы *lac*-оперона [27, 106], *trp*-оперона [112], гибридный *lac*—*trp*-промотор (*tac*-промотор) [9, 16], а также промотор P_L фага λ [8].

Участок Шайна — Дальгарно берут из прокариотического гена и помещают на различном расстоянии от вирусного инцидирующего кодона, от чего сильно зависит уровень экспрессии [105]. Некоторые белки, например белок G вируса везикулярного стоматита [112] или малый Т-антиген SV40 [9], пагубно действуют на рост *E. coli*. Поэтому в идеальной ситуации желательно их экспрессировать с помощью индуцибельного промотора. Бактерии выращивают в условиях, когда сначала экспрессию чужеродного гена подавляют, а затем индуцируют. Промотор *tac* сохраняет регуляторный участок от *lac*-оперона и может быть индуцирован добавлением к культуральной жидкости изопропил- β -D-тиогактозида (IPTG). С участием этого промотора синтезирован малый Т-антиген SV40 [9]. После индукции IPTG малый Т-антиген накапливается в количестве, составляющем 5—10% суммарного белка *E. coli*. Таким способом достигают высокого уровня экспрессии этого токсичного белка.

Из штаммов *E. coli* можно выделить функционально активные белки. Например, известно, что в клетках, зараженных SV40, малый Т-антиген SV40 разрушает цитоскелет [35]. Чтобы выяснить, действительно ли один этот белок отвечает за описанное действие, малый Т-антиген SV40 был очищен из лизатов клеток *E. coli*, экспрессирующих этот белок, и затем введен в клетки путем микроинъекций. В результате наблюдали разрушение цитоскелета [19] и это свидетельствует о том, что малый Т-антиген вызывает данный эффект независимо от присутствия других вирусных белков.

Экспрессия вирусных генов в дрожжевых клетках

Экспрессия в *E. coli* некоторых вирусных генов, таких как ген поверхностного антигена HBV, затруднительна. Чтобы облегчить ее, были разработаны векторы, позволяющие экспрессировать чужеродные гены в дрожжевых клетках. Поверхностный антиген HBV был экспрессирован в двух векторных системах [81, 137]. В одной из них ген, кодирующий поверхностный антиген, соединяли с промотором алкогольдегидрогеназы в дрожжевом челночном векторе [137]. Этот вектор содержит часть бактериальной плазмиды, точку начала репликации дрожжевой ДНК и дрожжевой ген *trp1* для отбора рекомбинантов. Рекомбинантные молекулы вводили в дрожжи путем трансформации и отбирали трансформанты. Полученный штамм экспрессировал негликозилированную 23К-форму поверхностного антигена. В дрожжах белок собирался в частицы размером 20 нм, похожие на частицы, обнаруживаемые в крови больных гепатитом.

Таким образом, дрожжи могут служить хорошей системой для экспрессии больших количеств белков вирусов эукариот, которые нуждаются в процессинге и сборке в условиях эукариотической клетки. При введении обезьянам очищенные (20 нм)-частицы обеспечивали невосприимчивость к заражению вирусом гепатита [73].

Экспрессия вирусных генов в клетках млекопитающих

Хотя гены вирусов эукариот способны экспрессироваться в прокариотических клетках при соединении с прокариотическими регуляторными сигналами, функции продуктов вирусных генов и регуляторные сигналы можно адекватно исследовать только в нормальных клетках хозяина. Использовано несколько подходов к исследованию экспрессии вирусных генов в эукариотических клетках: введение клонированного гена обратно в геном родительского вируса, введение клонированного гена в другие вирусные геномы или использование гетерологичного вирусного генома в качестве вектора, временная экспрессия клонированного вирусного гена после прямого введения в эукариотическую клетку и стабильное включение вирусного гена в клетку хозяина.

Большая часть этих подходов представляет собой введение вирусной ДНК непосредственно в эукариотическую клетку. Заражение путем введения молекул ДНК называется *трансфекцией*. Этот термин применяют также для обозначения введения субгеномных молекул вирусных ДНК (и, даже еще менее строго, для обозначения введения невирусной ДНК) в клетки. Поскольку нет системы для упаковки ДНК вирусов животных в частицы *in vitro*, для эффективного введения молекул ДНК в клетки разработаны специальные приемы. Наиболее распространенным и эффективным приемом для больших молекул ДНК служит осаждение ДНК фосфатом кальция [36]. Клетки поглощают преципитат и с ним ДНК проникает в клетки. В случае небольших кольцевых молекул ДНК введение в клетку можно облегчить с помощью ДЭАЭ-декстрана [74]. Для некоторых целей молекулы плазмидной ДНК можно ввести непосредственно при слиянии бактериальных клеток (несущих плазмиду) с эукариотическими клетками при помощи полиэтиленгликоля [116].

Молекулы ДНК можно также вводить в клетки микроинъекцией под давлением [1, 10] или ионофорезом [67]. Введение молекул ДНК в оплодотворенные ооциты может приводить к включению вирусной ДНК в клеточный геном и стабильному наследованию этих генов в последующих поколениях [33, 34].

Введение клонированных вирусных генов в родительский вирусный геном

Чтобы убедиться в функциональной активности вирусного гена, клонированного в рекомбинантной молекуле ДНК, он должен быть вновь включен в родительский геном. Некоторые клонированные молекулы вирусных ДНК не обладают биологической активностью [32, 51, 119]. Можно также перестроить *in vitro* соответствующую последовательность или ввести в нее мутацию, а затем включить мутантную форму молекулы в родительский геном. Методы введения мутаций *in vitro* рассматриваются в последующих разделах.

Из клонированных генов паповавирусов можно легко получить инфекционный геном [92]. Рекомбинантные ДНК расщепляют по сайтам, соединяющим вирусные и плазмидные ДНК, лигируют при низких концентрациях ДНК (для того чтобы стимулировать автолигирование), а затем трансфицируют ими чувствительные или перmissive клетки. У паповавирусов некоторые плазмидные векторы допускают репликацию ДНК с использованием вирусного сигнала начала репликации, и поэтому при трансфекции молекулы рекомбинантной ДНК могут реплицироваться [69]. Однако эти молекулы слишком велики, для того чтобы упаковываться в вирионы, и поэтому инфекционные вирионы не образуются.

Обратное введение клонированных субгеномных частей вирусных линейных ДНК-геномов более сложно. Во многих случаях для этого применяют метод спасения маркера, модифицированный для использования очищенных в геле фрагментов ДНК [60, 131]. Термин «спасение маркера» исходно указывал на то, что генетический маркер в инактивированном вирусе или фрагменте ДНК был бы утрачен, если бы не рекомбинировал с активным геномом или полноразмерной молекулой ДНК. Таким образом, спасение маркера может быть легко выявлено, если донорные молекулы придают фенотип, отличный от фенотипа реципиентного вируса. Чтобы определить место внедрения донорной молекулы ДНК, она должна генотипически отличаться от реципиентного генома. Часто для сообщения *ts*-мутантам *ts⁺*-фенотипа используют фрагменты ДНК дикого типа [60, 131]. В случае герпесвирусов и аденовирусов клонированные фрагменты ДНК смешивают с полноразмерными инфекционными ДНК и совместно трансфицируют ими клетки хозяина (рис. 8.1). Рекомбинация между молекулами двух типов проходит *in vivo*. После этого идентифицируют и отбирают вирусное потомство, которое получило маркеры дикого типа. В случае поксвирусов фрагменты ДНК вводят в клетки, которые заражают мутантными вирионами, поскольку поксвирусная ДНК неинфекционна. Не-

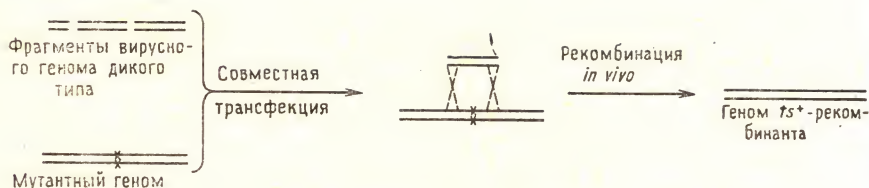


Рис. 8.1. Спасение маркера при совместной трансфекции молекулами вирусной ДНК. Показаны этапы спасения маркера с использованием ДНК-генома температурочувствительного мутанта и фрагментов вирусной ДНК дикого типа. Смешивают интактные молекулы мутантной ДНК с полным гидролизатом или индивидуальными фрагментами вирусной ДНК дикого типа, после чего проводят трансфекцию клеток. В зараженных клетках происходит рекомбинация между молекулами двух типов. После этого дочерние вирусы проверяют на наличие ts^+ -рекомбинантов [60, 131].

смотря на различие в способе введения, в клетке хозяина молекулы поксвирусной ДНК двух типов могут рекомбинировать.

Для введения клонированных вирусных фрагментов в инфекционный геном иногда можно использовать рекомбинацию *in vitro* (рис. 8.2). Для этого отбирают аденовирусные геномы, содержащие всего несколько сайтов расщепления рестриктон-

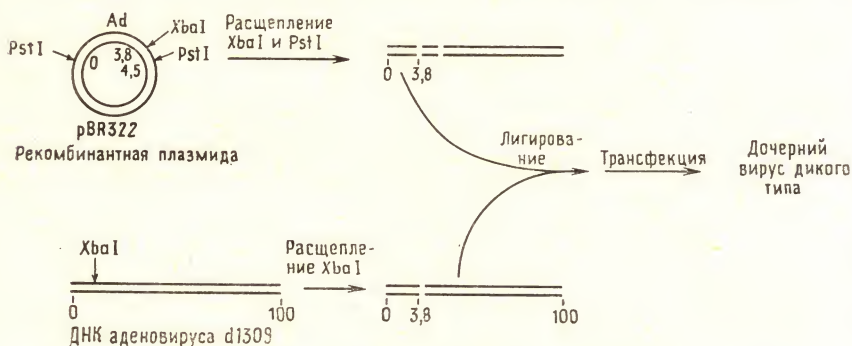


Рис. 8.2. Реконструкция аденовируса дикого типа из мутантной вирусной ДНК и рекомбинантной плазмиды. Рекombинантная плазмида содержит левый конец (от 0 до 4,5 единиц карты) аденовирусной ДНК, вставленный по *PstI*-сайту плазмиды pBR322. Аденовирусная часть ДНК плазмиды, представляющая собой геномную последовательность ДНК от левого конца до сайта расщепления рестриктонной эндонуклеазой *HpaI* в районе 4,5 единиц карты, была вставлена в *PstI*-сайт при помощи создания «хвостов» poly (G)—poly (C). Рекombинантную плазмиду расщепляли рестриктазами *PstI* и *XbaI*. ДНК аденовируса d1309 расщепляли рестриктазой *XbaI*. Большой фрагмент (от 3,8 до 100 единиц карты) лигировали с гидролизатом плазмиды, и лигазной смесью трансфицировали трансформированные аденовирусом клетки человека. Дочерний вирус образовывал бляшки на клетках HeLa и трансформированных аденовирусом клетках человека. Таким образом, дочерний вирус включил в свой состав фрагмент последовательности ДНК дикого типа от 0 до 3,8 единиц карты [129].

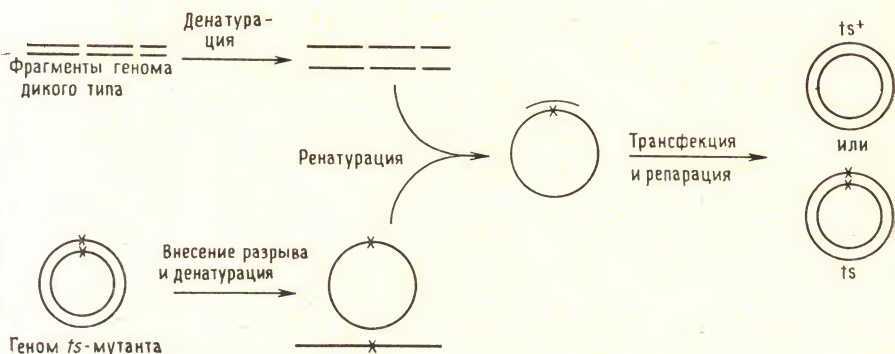


Рис. 8.3. Спасение маркера при образовании частичного гетеродуплекса. Этот метод широко применяли для вируса SV40 [62]. В геномную ДНК *ts*-мутанта вносили одноцепочечный разрыв, приводящий к переходу ДНК в форму II. Вирусную ДНК дикого типа расщепляли на множество фрагментов. Молекулы денатурировали и отжигали для образования частичных гетеродуплексов. Этой ДНК трансфицировали клетки, в которых неспаренные основания подвергались репарации, а одноцепочечные участки застраивались. Репарация проходит либо по одной, либо по другой цепи, поэтому образуются как мутанты, так и потомство дикого типа. (Рисунок приводится с разрешения из работы [62].)

ными эндонуклеазами. Например, мутант *dl309* аденовируса типа 5 имеет только один сайт расщепления *Xba*I в точке, соответствующей 3,8 единиц карты вирусного генома [57]. После клонирования левого конца аденовирусного генома от 0 до 4,5 единиц карты [129] вирусную вставку из рекомбинантной плазмиды расщепляли и лигировали с ДНК *dl309*, разрезанной *Xba*I. Лигированной смесью трансфицировали клетки человека, трансформированные аденовирусом, и собирали урожай вируса. Полученный вирус образовывал бляшки на клетках HeLa, следовательно, он содержал клонированные фрагменты ДНК дикого типа. Интересно, что клонированные нуклеотидные последовательности, лигированные с ДНК *dl309*, содержали как результат процедуры клонирования участок $\text{poly(dG)} : \text{poly(dC)}$, тогда как полученный вирусный геном не содержал этих последовательностей. Таким образом, аденовирус, вероятно, обладает механизмом, позволяющим восстанавливать один из концевых повторов [128, 129].

Введение фрагментов вирусных ДНК в кольцевые молекулы вирусных ДНК также может осуществляться путем лигирования *in vitro* [11] или образования *in vitro* частичного гетеродуплекса [62]. В последнем варианте случайная репарация неспаренных оснований приведет к включению новой последовательности в инфекционный геном (рис. 8.3).

Приведенные примеры показывают, каким образом клони-

рованные ДНК дикого типа могут быть введены в мутантный геном. Ниже обсуждается обратная ситуация, когда мутированные фрагменты вводят в геном дикого типа с образованием специфического мутантного генома.

Использование вирусных геномов в качестве векторов

Некоторые вирусные геномы после соответствующей перестройки приобретают способность служить векторами для репликации и экспрессии эукариотических генов. Этот вопрос подробно разработан во многих обзорах [19, 28, 103, 104], где описано, как можно использовать вирусы в качестве векторов для вирусных и для клеточных генов. К настоящему времени наиболее широко используемой вирусной системой является SV40. Молекула ДНК этого вируса была первой ДНК вирусов эукариот, для которой удалось определить последовательность оснований. Кроме того, молекулярная биология SV40 изучена более детально, чем какого-либо другого. Первые конструкции содержали несколько различных генов. Рекомбинантные молекулы реплицировались в эукариотических клетках, но мРНК не синтезировалась и экспрессии белка не наблюдалось [31]. Позднее стало понятно, что мРНК SV40 подвергаются сплайсингу [6, 43, 45], и, когда вставленные ДНК, кодирующие глобин, были ориентированы таким образом, чтобы мог происходить сплайсинг, была обнаружена экспрессия глобина [44, 87].

Чужеродную ДНК можно ввести в SV40 либо в раннюю, либо в позднюю области генома (гл. 26). При введении генов в позднюю область обычно наблюдают более высокий уровень экспрессии, так как поздний промотор более активен. Поскольку для вируса необходимы и ранние, и поздние белки, внедрение чужеродного гена приводит к образованию дефектного вирусного генома, и поэтому для сохранения рекомбинантной молекулы требуется вирус-помощник. Кроме того, максимальный размер генома SV40, который может быть упакован в вирионы, не должен значительно превышать 5243 пар оснований (bp), что соответствует нормальному размеру генома этого вируса. Таким образом, имеются ограничения на размер вставки ДНК в рекомбинантный геном, если последний должен упаковываться и сохраняться в вирусных частицах.

Другим подходом к использованию репликона SV40 была разработка клеточных линий, конститутивно экспрессирующих Т-антиген SV40 и другие факторы, необходимые для репликации ДНК SV40. Эти линии, названные клетками COS, получены трансформацией клеток CV-1 геномом SV40, который имел дефектный участок начала репликации [29]. Полученная клеточная

линия содержит последовательности SV40, которые не могут реплицироваться, но экспрессируют ранние вирусные продукты. Прямое введение рекомбинантных молекул ДНК, содержащих участок начала репликации SV40, приводит к репликации рекомбинантной молекулы в этих клетках. Таким образом, они служат эффективной системой для исследования экспрессии трансфицированных рекомбинантных молекул (см. след. раздел). Кроме того, рекомбинантные молекулы, содержащие вставленные в раннюю транскрипционную область чужеродные фрагменты ДНК, могут пассивироваться в виде чистых рекомбинантных молекул, поскольку вирус-помощник не требуется.

Векторы на основе SV40 способны экспрессировать как вирусные, так и клеточные гены, например гены β -глобина кролика [87], α - и β -глобинов мыши [44, 46], препроинсулина [41], поверхностного антигена HBV [85], белка G VSV [110] и гемагглютинаина вируса гриппа [25, 47, 133]. Поскольку гены большего размера нельзя клонировать в геноме SV40, в качестве альтернативных вирусных векторов использовали вирусные геномы большего размера. Для экспрессии больших количеств Т-антигена SV40 использовали аденовирусы [125, 136]. Рекомбинанты получали отбором аденовирусов на способность расти в клетках обезьян с последующей идентификацией тех из них, которые экспрессируют Т-антиген SV40.

Геномы вирусов папилломы относятся к экспрессирующим векторам другого типа. В клетках, трансформированных вирусом папилломы крупного рогатого скота (BPV), геном вируса находится в виде эписомной сверхспиральной кольцевой молекулы ДНК [63, 68, 82]. Последовательности ДНК-вставки реплицируются как часть молекулы ДНК BPV. Такой вектор имеет несколько преимуществ. Во-первых, геном BPV вызывает онкогенную трансформацию клеток, что можно использовать как признак для фенотипической селекции. Во-вторых, молекулы не интегрируют, так что уровни экспрессии исследуемого гена не зависят от фланкирующих последовательностей. В-третьих, молекулы ДНК кольцевые, поэтому были созданы векторы, которые могут при трансформации посредством ДНК прямо переноситься из *E. coli* в клетки млекопитающих и наоборот [17]. Длинный концевой повтор (LTR) вируса опухолей молочных желез мыши (MMTV) был встроен в вектор на основе BPV [89]. В результате получены различные трансформированные линии клеток. Показано, что рекомбинантные молекулы остаются неинтегрированными и не подвергаются перестройкам, однако тем не менее уровни экспрессии мРНК с различных промоторов MMTV в LTR сильно вариировали в различных линиях клеток. Транскрипция с промоторов MMTV может быть усилена обработкой глюкокортикоидным гормоном. Степень вызываемой ими индукции

также варьировала в различных клеточных линиях. Эти опыты показали, что на уровень экспрессии влияет не только непосредственное окружение ДНК в клеточном геноме.

На основе генома HSV сконструированы субгеномные репликоны [127, 130]. Большой размер генома HSV, а также данные о том, что он может нести вставку по крайней мере 8 тысяч пар оснований (kb) [60], позволяют предполагать, что он способен служить в качестве вектора. Однако экспрессии вставленного клеточного гена с собственного промотора не наблюдается (N. Frenkel, личное сообщение). Это, вероятно, связано с тем, что HSV подавляет транскрипцию и(или) трансляцию клеточных РНК. Для того чтобы HSV мог служить экспрессирующим вектором, вероятно, нужно, чтобы вставленные гены использовали промоторы и трансляционные сигналы вируса, либо необходимо создать варианты HSV, которые не подавляют экспрессии клеточных генов.

Подобно HSV поксвирусы содержат большой ДНК-геном, но в отличие от них имеют более сложный репликативный цикл. Поскольку поксвирусы используют для транскрипции ДНК в цитоплазме свой собственный аппарат, неудивительно, что встроенные в их геном чужеродные гены экспрессируются на низком уровне, если вообще экспрессируются. Однако, когда перед 5'-концом встроенного гена вставляли транскрипционный сигнал вируса осповакцины, наблюдалась экспрессия чужеродного гена. Рекомбинанты создавали в два этапа. Чужеродный ген встраивали при рекомбинации *in vitro* таким образом, что ген оказывался расположенным после промотора вируса осповакцины. Рекомбинантными ДНК трансфицировали клетки после заражения вирусом осповакцины. Гибридные молекулы включались в вирус путем рекомбинации *in vivo* [88, 140]. Есть сообщения об экспрессии поверхностных антигенов HBV [91, 122], гемагглютинина вируса гриппа [90, 123] и гликопротеина D HSV [91]. Более того, рекомбинанты индуцируют иммунный ответ, ограничивающий репликацию соответственно вирусов гепатита В, гриппа и HSV. Поскольку эти рекомбинанты представляют собой живые вакцины в том смысле, что вирусные антигены экспрессируются на поверхности клеток хозяина, антивирусный иммунитет к ним, вероятно, обеспечен как гуморальным, так и клеточным механизмами. Таким образом, гибридные вирусы служат прекрасными кандидатами для антивирусной терапии, поскольку об эффектах вакцинации вирусом осповакцины известно очень много; и что особенно важно, при этом можно обходиться без более рискованного применения других аттенуированных вирусов.

Для использования в качестве векторов сконструированы также варианты геномов ретровирусов. В рекомбинантные мо-

лекулы ДНК различных провирусов был встроен ген тимидинкиназы HSV [118, 134, 139]. Этими ДНК трансфицировали клетки с фенотипом *tk*⁻, после чего отбирали трансформанты. Инфекционный вирус, содержащий *tk*-ген, может быть получен при суперинфекции вирусом-помощником, или при совместной трансфекции с полноразмерной вирусной ДНК. Включение *tk*-гена приводит к повреждению части репликативных функций, поэтому для восполнения этих функций требуется вирус-помощник.

Необходимость ретровирусного генома-помощника может быть снята при использовании клеточной линии, которая представляет все функции для репликации и упаковки ретровирусов, но не дает инфекционного вируса [71]. Сконструированы мутантные ретровирусы, которые утратили последовательности РНК, необходимые для упаковки, включения РНК в капсид и одевания в оболочку. При заражении клеток провирус включается в клеточный геном, после чего синтезируются вирусные РНК и белки. Эти клетки представляют собой идеальную систему для размножения рекомбинантных, дефектных по репликации геномов. Трансфекция этих клеток дефектными геномами приводит к образованию вирионов, содержащих преимущественно рекомбинантные геномы [71]. Такие вирионы потенциально свободны от цитолитических и трансформирующих функций и очень удобны в качестве векторных систем.

Временная экспрессия вирусных генов в эукариотических клетках

После того как были клонированы эукариотические гены и отработаны приемы для введения молекул ДНК прямо в клетки, было обнаружено, что экспрессия многих клеточных генов наблюдается в течение короткого времени после трансфекции [93]. Это явление было названо краткосрочной, или временной, экспрессией. За экспрессией гена следили при помощи иммунофлуоресценции со специфическими антителами [4] или путем обнаружения мРНК различными гибридизационными методами [42]. Количество клеток, в которых наблюдали экспрессию, колеблется от 1 [93] до 90% [100], причем более обычными были низкие цифры. Экспрессия достигает максимума примерно через 48—72 ч после введения ДНК и через какое-то время становится незаметной. Это, вероятно, связано с утратой молекул ДНК клетками. Использование данного подхода очень полезно для анализа участков, регулирующих экспрессию эукариотических генов; много исследований проведено и с вирусными генами.

Форма, в которой находится ДНК после введения, подробно еще не охарактеризована. В одной работе показано, что геном

SV40 собирается в хроматин, содержащий нуклеазочувствительные участки около точки начала репликации [54]. По-видимому, после трансфекции ДНК собирается в нуклеосомные структуры подобно тому, как это происходит в ходе литической инфекции. Временную экспрессию использовали для изучения действия позитивных транскрипционных факторов. Преддранные гены аденовирусов и вирусов герпеса индуцируют экспрессию вирусных генов в ходе литической инфекции [7, 18, 56, 60, 138]. Для того чтобы показать, что эти гены способны регулировать экспрессию вирусных генов независимо от других вирусных генов, плазмиды, кодирующие ген E1A аденовируса или преддранный ген вируса псевдобешенства, трансфицировали совместно с геном, кодирующим ДНК-связывающий 72К-белок (DBP) аденовируса. Оба предданных гена увеличивали транскрипцию гена DBP [53]. Таким образом, эти регуляторные гены кодируют позитивные активаторы, действующие в транс-положении по отношению к гену DBP. Кроме того, эти активаторы могут заменить потребность в энхансерной последовательности, необходимой для высокого уровня экспрессии клеточного гена. Совместная трансфекция с геном E1A аденовируса или с предданными генами вируса псевдобешенства снимает необходимость энхансерной последовательности для экспрессии гена β -глобина [2, 39]. Таким образом, эти вирусные активаторные функции могут действовать через нормальные клеточные регуляторные каналы. Временную экспрессию использовали для исследования регуляции экспрессии вирусных генов. Простота системы и быстрота постановки экспериментов делают этот подход удобным и полезным.

Стабильная интеграция вирусных генов с клеточным геномом

Клеточная трансформация представляет собой изменение фенотипа клеток в результате приобретения новых ДНК-последовательностей [93]. Приобретение вирусных генов клеткой может вести к изменению ее ростовых свойств. Введение в клетки ДНК опухолеродных вирусов ведет к изменениям в росте клеток, и это явление также называют трансформацией. По мере того как число известных механизмов онкогенеза увеличивается, возникает терминологическая путаница, поскольку все они носят название «трансформация». Изменение в ростовых свойствах, вероятно, следует называть ростовой или онкогенной трансформацией клеток лишь в том случае, если изменение фенотипа четко связано с введением новых фрагментов ДНК.

Клеточные линии, стабильно экспрессирующие генные продукты вируса, удобны в качестве клеток-хозяев для поддержания мутантных вирусов, дефектных по специфическим вирусным

генам. Клетки, онкогенно трансформированные ДНК-содержащими вирусами, часто стабильно экспрессируют генные продукты вируса, и первоначально они служили в качестве перmissive клеток для мутантов с ограниченным спектром хозяев, или вирусов, чьи способности к росту варьируют в различных клетках-хозяевах. Вирусные гены сохраняются благодаря тому, что селективное давление дает преимущество фенотипу трансформированных клеток. Клетки мыши, трансформированные вирусом полиомы, служили в качестве клеток-хозяев для мутантов вируса полиомы с ограниченным спектром хозяев [3]. Эти мутанты чрезвычайно важны для выявления генных продуктов вируса полиомы, ответственного за онкогенную трансформацию (гл. 12). Аналогично этому клетки человека линии 293, трансформированные аденовирусом, стабильно экспрессируют E1-участок генома аденовируса [37]. Они служили в качестве клеток-хозяев для выделения и поддержания мутантов аденовируса по спектру хозяев, что позволило определить функцию продуктов генов E1A и E1B [7, 56].

Другие вирусные гены не обладают заметным фенотипическим действием на клетку-хозяина, и поэтому их закрепление в геноме и экспрессия не могут быть непосредственно отобраны. В данном случае их следует вводить совместно с селектируемым маркером. Клонировано несколько генов с селектируемым фенотипом, первый из которых — ген тимидинкиназы HSV. Рост клеток на среде ГАТ (ростовая среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин) требует синтеза клетками тимидинкиназы [66]. Таким образом, клетки *tk*⁻ можно трансформировать к фенотипу *tk*⁺ включением гена *tk* HSV с последующим отбором на среде ГАТ. Селекция на утрату гена *tk* может быть осуществлена путем роста на среде с бромдезоксинуридином. Вначале было обнаружено, что любая ДНК, введенная в клетку вместе с геном *tk* в составе одного кальцийфосфатного осадка, оказывается физически сцепленной с этим геном [94]. Эти молекулы, вероятно, соединяются конец-в-конец после вхождения в клетку и остаются в виде единой молекулы. Отбор на ген *tk* приводит к отбору и на другие связанные с ним фрагменты ДНК. Таким способом были отобраны трансформанты, экспрессирующие ДНК-связывающий белок аденовируса [40, 114].

Процедура отбора с использованием гена *tk* не универсальна, она наилучшим образом реализуется в клетках *tk*⁻. Найдено два доминантных селектируемых маркера, которые можно использовать на более широком спектре клеток-хозяев. Первым является ген ксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы (*gpt*) *E. coli*, кодирующий фермент, который позволяет эукариотическим клеткам расти в присутствии ксантина и образовывать гуанозинмонофосфат при блокировании нормального биосинте-

тического пути микофеноловой кислотой [86]. Этот фермент обычно закодирован только в прокариотических клетках *E. coli*, и поэтому его ген может быть использован в качестве селективируемого маркера в клетках эукариот всех типов. Вторым селективируемым маркером служит ген аминокликозид-фосфотрансферазы из транспозона *Tn5* *E. coli*. Этот фермент экспрессируется в эукариотических клетках, если его ген снабдить эукариотическим промотором и сигналом полиаденилирования. Его селективное фенотипическое выражение обусловлено тем, что он инактивирует антибиотик G418 и предотвращает его действие на клетки эукариот [55]. Ген этого фермента также служит доминантным селективируемым маркером.

В нескольких работах исследовали состояние фрагментов ДНК после трансформации. В результате переноса гена *tk* HSV из одной клетки в другую при передаче хромосом обнаружено два типа трансформантов. Трансформанты одного из них не пригодны для поддержания *tk*⁺-фенотипа; в них донорная хромосома распределялась в виде небольших кусочков по всему карнотику. Трансформанты другого типа имели стабильный фенотип *tk*⁺ и содержали интактную донорную хромосому [59]. Трансформирующие последовательности, которые стабильно поддерживались, интегрировались с хромосомой клеток-реципиентов. В дальнейших исследованиях было показано, что последовательности, введенные совместно с геном *tk* HSV включаются в уникальный сайт клеточной хромосомы [107]. Гибридизацией *in situ* обнаружено, что в каждой клеточной линии трансформирующие фрагменты включались каждый раз в новый уникальный сайт хромосомы. Это свидетельствует о том, что включение не определяется какими-либо протяженными участками гомологии. Таким образом, эти методы введения ДНК в соматические клетки представляют собой эффективный подход для встраивания ДНК в случайные сайты клеточного генома, однако они не обеспечивают стабильного замещения предсуществующих гомологичных участков ДНК.

Мутагенез вирусных ДНК *in vitro*

Наиболее благотворное влияние технологии рекомбинантных ДНК на генетику вирусов связано прежде всего с тем, что с ее появлением стало возможно проводить мутагенез специфических последовательностей ДНК *in vitro*. Некоторые приемы мутагенеза, описанные ниже, были использованы на неклонированных фрагментах ДНК, причем эти приемы значительно облегчаются при использовании клонированных фрагментов. Другие приемы возможны только при работе с клонированными фрагментами ДНК. После мутагенеза фрагменты ДНК могут быть возвраще-

ны в инфекционный вирусный геном или введены в эукариотическую клетку, как описано выше. Критическим моментом является наличие чувствительного и надежного метода фенотипического анализа действия мутации. Различают фенотипические тесты двух основных типов. В тестах первого типа делают попытки обнаружить нуклеотидные последовательности, действующие в положении цис по отношению к экспрессии генов или репликации вирусного генома. Примерами цис-действующих элементов служат промоторы транскрипции и энхансеры, а также участки начала репликации. Фенотипические тесты второго типа проводят с целью определить функцию специфических кодирующих последовательностей путем их изменения. В этом случае необходимо разработать метод фенотипического анализа функции соответствующего генного продукта.

Введение делеционных мутаций

Введение делеций в вирусные геномы широко использовали в генетике вирусов еще до получения клонированных вирусных геномов. Делеционные мутанты SV40 получали линеаризацией ДНК по определенным или случайным сайтам с последующей трансфекцией клеток. Нуклеазы в клетках отщепляли концы молекулы до циклизации и начала репликации. Жизнеспособные делеционные мутанты отбирались сами [76], а нежизнеспособные поддерживались благодаря их комплементации с температурочувствительными мутантами [61, 77]. Появление клонированных молекул ДНК SV40 позволило вводить в них делеции и набирать эти молекулы в *E. coli* независимо от жизнеспособности вируса. После этого вставку вирусной ДНК можно вырезать из рекомбинантной плазмиды, лигировать с идентичными или другими фрагментами ДНК вируса и трансфицировать ими клетки для того, чтобы проверить жизнеспособность мутантного вируса [92].

Делеции использовали для тестирования функций специфических кодирующих участков ДНК. Серия мутантов с делециями в ранней области SV40 кодирует укороченные в разной степени молекулы большого Т-антигена [95, 96]. Свойства мутантных белков исследовали с целью локализации определенных участков молекулы белка, ответственных за различные функции Т-антигена [14, 126]. Пользуясь аналогичным подходом, удалось показать, что С-конец гликопротеина VSV служит мембранным якорем [110]. В дальнейшем выяснили, что структура цитоплазматического домена этого белка влияет на созревание в процессе его перемещения на поверхность клетки [109].

Делеционный анализ использовали также для выявления участков ДНК, регулирующих экспрессию ранней области транс-

крипции SV40. В область перед точкой начала ранней транскрипции были введены различные делеции. Делеция области, названной последовательностью ТАТА, расположенной примерно за 30 пар оснований от точки начала транскрипции, изменяет положение этой точки при введении гена в клетки [4, 26]. Следовательно, эта последовательность требуется для правильного выбора 5'-конца мРНК. Делеция последовательностей перед ТАТА полностью снимает экспрессию ранних генов [4]. В этой области расположен регуляторный участок, состоящий из 72 пар оснований и представленный дважды повторяющейся последовательностью за 100—175 пар оснований до начала транскрипции. Делеция, выходящая за пределы одного повтора, подавляет транскрипцию [42]. Впоследствии было показано, что этот участок из 72 пар оснований является общим энхансером экспрессии генов, поскольку он усиливает экспрессию и других генов, помещенных перед или за ним [2], причем его действие не зависит от его положения по отношению к генам, экспрессию которых он усиливает.

Делеция сближает соседние участки ДНК. Возникшая близость последовательностей потенциально может иметь такой же сильный эффект, как и сама делеция. Для того чтобы этого избежать, был разработан уникальный набор мутаций. При исследовании транскрипционных сигналов перед геном тимидинкиназы HSV Мак-Найт и Кингсбери [75] создали делеционные мутанты по последовательностям, предшествующим гену *tk*. На место делеции они ввели линкерную последовательность *Bam* HI длиной 10 пар оснований. Мутанты, у которых концы делеции были разделены десятью парами оснований, рекомбинировали *in vitro* путем лигирования по *Bam* HI-сайту. Это привело к изменению последовательности таким образом, что 10 пар оснований оказались замененными на линкерную последовательность. Относительные расстояния были сохранены такими же, как и в неделетированной последовательности. Создана целая серия таких мутантов, названных *мутантами с подвижным линкером*. Рекомбинантные плазмиды вводили в ооциты *Xenopus laevis* и определяли уровень экспрессии РНК. Для транскрипции важны три участка: последовательность ТАТА за 16—32 нуклеотида до точки начала транскрипции, богатая гуанозином последовательность на расстоянии 47—61 нуклеотидов перед ней и последовательность за 97—105 нуклеотидов до начала гена *tk*. Этот подход позволил провести детальный анализ и определение трех различных регуляторных сигналов перед геном *tk*.

Путем модификации описанной выше процедуры делеции были введены в геном аденовируса. Делецию можно ввести в клонированный фрагмент ДНК аденовируса. Его выщепляют из плазмиды и лигируют с другим фрагментом ДНК аденовируса

с образованием инфекционного генома. Таким способом обнаружили, что для эффективного роста аденовируса необходима малая РНК VAI. Кроме того, показано, что эта РНК усиливает трансляцию поздних вирусных мРНК. Эти работы подтвердили, что малая РНК VAI является составной частью механизма, регулирующего трансляцию вирусных мРНК.

Введение точечных мутаций

В этом разделе мы обсудим различные подходы, используемые для введения точечных мутаций в вирусные ДНК *in vitro* и приведем соответствующие примеры. Одним из наиболее простых подходов к локальному мутагенезу является химическая модификация фрагментов ДНК *in vitro* с последующей трансфекцией мутированных фрагментов ДНК совместно с инфекционным геномом дикого типа [13, 113]. Мутированные участки включают в инфекционный вирус путем рекомбинации *in vivo*. Дочернее потомство отбирают по определенному фенотипу, например по температурочувствительности. При таком подходе мутагенез ограничен определенными участками генома. Его применяли для мутирования участка генома HSV, кодирующего основной ДНК-связывающий белок, называемый ICP8. Путем мутагенеза фрагмента ДНК *in vitro* гидроксиламином с последующей рекомбинацией *in vivo* с геномом дикого типа был создан температурочувствительный мутант *ts* HA1. Мутация картируется в последовательности, кодирующей ICP8 (или рядом с ней) [15]. В последующих экспериментах по комплементации было показано, что этот мутант аналогичен большой группе мутантов, выделенных ранее [141]. Идентификация мутаций по этому гену позволила проводить генетический анализ функций ДНК-связывающего белка HSV [30, 65].

Для введения точечных мутаций в кольцевые геномы папавирусов разработаны более тонкие приемы. Первый прием сайт-специфического мутагенеза включает отбор мутантов с утраченными участками расщепления рестрикционными эндонуклеазами [121]. ДНК SV40 расщепляли рестрикционной эндонуклеазой в присутствии бромистого этидия. В этих условиях фермент делал разрывы только в одной цепи ДНК. Концы разорванных цепей отщепляли экзонуклеазой, что приводило к образованию коротких одноцепочечных пробелов. Одноцепочечные ДНК обрабатывали мутагенными реагентами, специфичными к одноцепочечной ДНК, такими как ион бисульфита. Затем пробелы застраивали и отбирали геномы, утратившие сайты рестрикции. Эту процедуру применяли для получения мутантов по сайту расщепления *Bgl* I в геноме SV40 [120]. Такой способ мутагенеза дал несколько мутантов по точке начала репликации ДНК. Ско-

рость и уровень репликации мутантных геномов отличались по сравнению с диким типом. Измененный фенотип не восстанавливался при совместном заражении с вирусом дикого типа. Таким образом, в этих исследованиях удалось выявить последовательности ДНК, контролирующие ее репликацию в положении цис.

Второй прием сайт-специфической индукции точечных мутаций, не применявшийся сколько-нибудь широко для вирусных геномов, включает образование одноцепочечных петель вытеснения ДНК (D-петель). Отжиг небольшого рестрикционного фрагмента с кольцевой молекулой ДНК ведет к гибридизации данного фрагмента и вытеснению одной цепи. Это вытеснение облегчается белком *гесА* *E. coli*. Далее можно провести химическую модификацию экспонированной одноцепочечной последовательности. Это позволяет избирательно мутировать любой участок, из которого получен фрагмент ДНК.

Третий метод сайт-специфического мутагенеза включает использование синтетического олигонуклеотида, содержащего требующуюся мутацию. Этот олигонуклеотид отжигают с одноцепочечной ДНК и полученным гибридом трансфицируют клетку. Произвольная репарация неспаренных оснований ведет к закреплению мутации в инфекционном геноме. Так, например, в ходе получения мутаций [11] синтетический олигонуклеотид гибридизовали с цепью ДНК вируса полиомы, клонированной в фаге M13. Этой ДНК трансфицировали *E. coli* и идентифицировали клоны M13, которые содержали мутированные последовательности. Репликативную форму ДНК одного из этих клонов M13 расщепляли и лигировали с фрагментами вирусной ДНК для образования инфекционного вирусного генома. Полученный мутантный геном содержал терминирующий кодон типа *ochge* в рамке, кодирующей средний Т-антиген, и кодон валина вместо кодона аланина в перекрывающейся рамке, детерминирующей малый Т-антиген. Таким образом, этот подход позволил исследователям укоротить белок в одной из двух рамок считывания. Мутантный средний Т-антиген утратил 37 аминокислот на С-конце и стал дефектным по прикреплению к мембранам и протеинкиназной активности, а мутантный вирус дефектен по трансформации клеток. Эти результаты четко свидетельствуют о роли среднего Т-антигена в опухолевой трансформации клеток вирусом полиомы.

Включение последовательностей вирусных ДНК в новые сайты вирусного генома

Еще одной формой мутации вирусного генома является его перестройка или включение фрагментов вирусных ДНК в новые сайты генома. Хотя последовательности вирусных ДНК иногда включа-

ются в новые сайты спонтанно, эти случаи относительно редки и поэтому геномные перестройки необходимо либо отбирать, либо конструировать. Для исследования удобен ген *tk* HSV, поскольку существует процедура отбора вирусов *tk*⁺ и *tk*⁻. Ген *tk* с мутацией был введен в геном HSV, после чего туда был встроен функционально активный ген *tk*, слитый с регуляторной областью одного из альфа-генов (предранних). Это привело к превращению гена *tk* из раннего в предранний; следовательно, области перед геном определяют период экспрессии в ходе инфекции.

Одним из наиболее впечатляющих примеров вирусного генома, содержащего реорганизованные последовательности, является мутант SV40, геном которого содержит транспозицию между ранней и поздней областями [64]. В этом геноме область, содержащая точку начала репликации, и область, содержащая ранний и поздний сигналы транскрипции, были инвертированы. В результате ген Т-антигена оказался возле позднего промотора, а поздняя область рядом с ранним промотором. Этот геном экспрессирует Т-антиген с позднего промотора и при заражении содержащим его мутантом происходит повышенная наработка Т-антигена. При этом Т-антиген, вероятно, не осуществляет негативную регуляцию своего синтеза, как это происходит в случае нормального генома; вместо этого он может усиливать поздний промотор и свою собственную экспрессию. Данная работа показала, что поздний промотор может использоваться без предварительной экспрессии раннего гена. Этот мутантный вирус дает уникальную возможность исследования позднего промотора SV40.

Селекция вирусных мутантов с изменениями в определенных белках

Для отбора и идентификации вирусных мутантов, которые имеют изменения в определенных белках, был использован дополнительный генетический подход. Этот подход включает отбор вирусов, которые кодируют белки, не узнаваемые моноклональными антителами, специфичными к белку дикого типа. Наиболее прост отбор вирусов, которые нельзя нейтрализовать моноклональными антителами, специфичными к одному из поверхностных белков вириона [24]. Отбираемые вирусы содержат антигенно измененные поверхностные белки. Таким способом проведен широкий анализ гемагглютинирина вируса гриппа. Были секвенированы гены гемагглютинирина мутантных вирусов и установлено положение мутаций. После этого удалось определить положение измененных аминокислот в кристаллической структуре молекулы гемагглютинирина. В результате были картированы основные антигенные детерминанты в трехмерной структуре этого белка. Детальное описание этой работы приведено в гл. 4.

Мутации этих антигенных вариантов или мутантных штаммов обычно не влияют явным образом на вирусную репликацию. Для картирования мутаций, резистентных к моноклональным антителам (*mar*, от англ. monoclonal antibody-resistant) у HSV, разработана следующая новая методика [52]. Антитела, узнающие поверхностные антигены, связываются с клетками. Вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, связываются с первыми. Пероксидаза катализирует реакцию с субстратом 4-хлор-1-нафтолом, приводя к образованию темного осадка на клетках, с которыми связаны антитела. Все бляшки, полученные от вирусов, кодирующих белок, узнаваемый антителами, становятся черными в то время, как мутантные бляшки бесцветные. После трансфекции клеток мутантным геном совместно с различными фрагментами ДНК дикого типа дочерние вирусы тестировали на способность образовывать черные бляшки. Черные бляшки наблюдали в тех случаях, когда происходила рекомбинация с образованием дикого типа. С помощью описанной модифицированной методики спасения маркера удалось картировать мутации.

Заключение

В этой главе описаны некоторые наиболее важные подходы, использованные при изучении молекулярной генетики вирусов человека и животных, и некоторые приложения этих методов. Из-за ограниченности объема главы невозможно сделать полный обзор всей литературы в области молекулярной генетики вирусов. Большая часть цитированных примеров взята из исследований ДНК-содержащих вирусов, поскольку переносить клонированные ДНК в инфекционный геном легче, чем воспроизводить инфекционную РНК из клонированной последовательности ДНК. Тем не менее недавнее сообщение о том, что полная копия клонированной кДНК вируса полиомиелита инфекционна [98], создает перспективу использования мутагенеза *in vitro* для клонированных копий РНК-геномов. Это в большой степени будет способствовать развитию генетики РНК-содержащих вирусов. И хотя нет необходимости менять каждую пару оснований в геноме, скоро станет возможной замена по выбору любого нуклеотида, для того чтобы определить его функцию.

Литература

1. Anderson W., Killos L., Sander-Haigh L., Kretschmer P. J., Diacumakos E. G. (1980). Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5399—5403.
2. Banerji J., Rusconi J., Schaffner W. (1981). Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 sequences, *Cell*, 27, 299—308.
3. Benjamin T. L. (1970). Host range mutants of polyoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 394—399.

4. Benoist C., Chambon P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region, *Nature*, **290**, 304—310.
5. Benton W. D., Davis R. W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ, *Science*, **196**, 180—182.
6. Berk A. J., Sharp P. A. (1978). Spliced early mRNAs of simian virus 40, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1274—1278.
7. Berk A. J., Lee F., Harrison T., Williams J., Sharp P. A. (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs, *Cell*, **17**, 935—944.
8. Bernard H.-V., Helinski D. R. (1979). Use of the λ phage promoter P_L to promote gene expression in hybrid plasmid cloning vehicles, *Methods Enzymol.*, **68**, 482—494.
9. Bikel I., Roberts T. M., Bladon M. T., Green R., Amann E., Livingston D. M. (1983). Purification of biologically active simian virus 40 small tumor antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 906—910.
10. Capecchi M. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells, *Cell*, **22**, 479—488.
11. Carmichael G. C., Schaffhausen B. S., Dorsky D. I., Oliver D. B., Benjamin T. L. (1982). Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities and cell transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3579—3583.
12. Chen E. Y., Howley P. M., Levinson A. D., Seeburg P. H. (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papilloma virus type 1 genome, *Nature*, **299**, 529—533.
13. Chu C.-T., Parris D. S., Dixon R. A. F., Farber F. E., Schaffer P. A. (1979). Hydroxylamine mutagenesis of HSV DNA and DNA fragments: Introduction of mutations into selected regions of the viral genome, *Virology*, **98**, 168—181.
14. Clark R., Peden K., Pipas J. M., Nathans D., Tjian R. (1983). Biochemical activities of T-antigen proteins encoded by simian virus 40 A gene deletion mutants, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 220—228.
15. Conley A. J., Knipe D. M., Jones P. C., Roizman B. (1981). Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of Γ polypeptides, *J. Virol.*, **37**, 191—206.
16. deBoer H. A., Comstock L. J., Vasser M. (1983). The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 21—25.
17. DiMaio D., Treisman R., Maniatis T. (1982). Bovine papilloma virus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacterial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4030—4034.
18. Dixon R. A. F., Schaffer P. A. (1982). Fine-structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175, *J. Virol.*, **36**, 189—203.
19. Elder J. T., Spritz R. A., Weissman S. M. (1981). Simian virus 40 as a eukaryotic cloning vehicle, *Annu. Rev. Genet.*, **15**, 295—340.
20. Farrell P., Baer R., Bankier A., Biggin M., Deininger P., Gibson T., Hudson G., Seguin C., Satchwell S., Barrell B. (1983). Abstracts of the Eighth International Workshop on Herpesviruses, Oxford, England.
21. Fiers W., Contreras R., Haegeman G., Rogiers R., van de Woorde A., van Heuverswyn H., van Herreweghe J., Volckart G., Ysebart M. (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA, *Nature (Lond.)*, **273**, 113—120.
22. Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., Tiollais P., Charnay P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*, *Nature*, **281**, 646—650.
23. Gallione C. J., Greene J. R., Iverson L. E., Rose J. K. (1981). Nucleotide se-

- quences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus N and NS proteins, *J. Virol.*, **39**, 529—535.
24. Gerhard W., Webster R. G. (1978). Antigenic drift in influenza viruses. I. Selection and characterization of antigenic variants of A/Pr/8/34 (HONI) influenza virus with monoclonal antibodies, *J. Exp. Med.*, **148**, 383—392.
 25. Gething M. J., Sambrook J. (1981). Cell surface expression of influenza hemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene, *Nature*, **293**, 620—625.
 26. Ghosh P. K., Lebowitz P., Frisque R. J., Gluzman Y. (1981). Identification of a promoter component involved in positioning the 5' termini of simian virus 40 early mRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 100—104.
 27. Gilmer T., Parsons J. T., Erikson R. L. (1982). Construction of plasmids for expression of Rous sarcoma virus transforming protein, p60^{src}, in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2152—2156.
 28. Gluzman Y. (1982). Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 29. Gluzman Y., Sambrook J., Frisque R. J. (1980). Expression of early genes of origin-defective mutants of simian virus 40, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3898—3902.
 30. Godowski P. J., Knipe D. M. (1983). Mutations in the major DNA-binding protein gene of herpes simplex virus type 1 result in increased levels of viral gene expression, *J. Virol.*, **47**, 478—486.
 31. Goff S. P., Berg P. (1976). Construction of hybrid viruses containing SV40 and λ phage DNA segments and their propagation in cultured cells, *Cell*, **9**, 695—705.
 32. Goff S. P., Tabin C. J., Wang J. Y.-J., Weinberg R. A., Baltimore D. (1982). Transfection of fibroblasts by cloned Abelson murine leukemia virus DNA and recovery of transmissible virus by recombination with helper virus, *J. Virol.*, **41**, 271—285.
 33. Gordon J. W., Ruddle F. H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei, *Science*, **214**, 1244—1246.
 34. Gordon J. W., Scarnos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A., Ruddle F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7380—7384.
 35. Graessmann A., Graessmann M., Tjian R., Topp W. C. (1980). Simian virus small-t protein is required for loss of actin cable networks in cells, *J. Virol.*, **33**, 1182—1191.
 36. Graham F. L., van der Eb A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology*, **52**, 456—467.
 37. Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J. Gen. Virol.*, **36**, 59—72.
 38. Gray M. R., Colot H. V., Guarente L., Rosbash M. (1982). Open reading frame cloning: Identification, cloning and expression of open reading frame DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6598—6602.
 39. Green M. R., Treisman R., Maniatis T. (1983). Transcriptional activation of cloned human β -globin genes by viral immediate-early genes, *Cell*, **35**, 137—148.
 40. Grodzicker T., Klessig D. F. (1980). Expression of unselected adenovirus genes in human genes co-transformed with the HSV *tk* gene and adenovirus 2 DNA, *Cell*, **21**, 453—463.
 41. Gruss P., Khoury G. (1981). Expression of a simian virus 40-rat preproinsulin recombinant in monkey kidney cells: Use of preproinsulin RNA processing signals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 133—137.
 42. Gruss P., Dhar R., Khoury G. (1981). Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 943—947.

43. Gruss P., Lai C. J., Dhar R., Khoury G. (1979). Splicing as a requirement of biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4317—4321.
44. Hamer D. H., Leder P. (1979). Expression of the chromosomal mouse β -globin gene cloned in SV40, *Nature (Lond.)*, **281**, 35—40.
45. Hamer D. H., Leder P. (1979). Splicing and formation of stable RNA, *Cell*, **18**, 1299—1302.
46. Hamer D. H., Kaehler M., Leder P. (1980). A mouse globin gene promoter is functional in SV40, *Cell*, **21**, 697—708.
47. Hartman J. R., Nayak D. P., Fareed G. C. (1982). Human influenza virus hemagglutinin is expressed in monkey cells using simian virus 40 vectors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 233—237.
48. Heller M., van Santen V., Kieff E. (1982). Simple repeat sequence in Epstein-Barr virus DNA is transcribed in latent and productive infections, *J. Virol.*, **44**, 311—320.
49. Hennessy K., Kieff E. (1983). One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine-alanine copolymer domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5665—5669.
50. Hennessey K., Heller M., van Santen V., Kieff E. (1983). Simple repeat array in Epstein-Barr virus DNA encodes part of the Epstein-Barr nuclear antigen, *Science*, **220**, 1396—1398.
51. Highfield P. E., Rafield L. F., Gilmer T. M., Parsons J. T. (1980). Molecular cloning of avian sarcoma virus closed circular DNA: Structural and biological characterization of three recombinant clones, *J. Virol.*, **36**, 271—279.
52. Holland T. C., Sandri-Goldin R. M., Holland L. E., Martin S. D., Levine M., Glorioso J. C. (1983). Physical mapping of the mutation in an antigenic variant of herpes simplex virus type 1 by use of an immunoreactive plaque assay, *J. Virol.*, **46**, 649—652.
53. Imperiale M. J., Feldman L. T., Nevins J. R. (1983). Activation of gene expression by adenovirus and herpes virus regulatory genes acting in *trans* and by a *cis*-acting adenovirus enhancer element, *Cell*, **35**, 127—136.
54. Innis J. W., Scott W. A. (1983). Chromatin structure of simian virus 40—pBR322 recombinant plasmids in COS-1 cells, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2203—2210.
55. Jiminez A., Davies J. (1980). Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*, *Nature (Lond.)*, **287**, 869—871.
56. Jones N., Shenk T. (1979). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other viral genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3665—3669.
57. Jones N., Shenk T. (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells, *Cell*, **17**, 683—689.
58. Kitamura N., Semler B. L., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler C. J., Dornier A. J., Emini E. A., Hanecak R., Lee J. J., van der Werf S., Anderson C. W., Wimmer E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA, *Nature (Lond.)*, **291**, 547—553.
59. Klobutcher L. A., Miller C. L., Ruddle F. H. (1980). Chromosome-mediated gene transfer results in two classes of unstable transformants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3610—3614.
60. Kripe D. M., Ruyechan W. T., Roizman B., Halliburton I. W. (1978). Molecular genetics of herpes simplex virus. Demonstration of regions of obligatory and non-obligatory identity with diploid regions of the genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3896—3900.
61. Lai C.-J., Nathans D. (1974). Deletion mutants of simian virus 40 generated by enzymatic excision of DNA segments from the viral genome, *J. Mol. Biol.*, **89**, 179—193.

62. *Lai C.-J., Nathans D.* (1974). Mapping temperature-sensitive mutants of SV40: Rescue of mutants by fragments of viral DNA, *Virology*, **60**, 466—475.
63. *Law M.-F., Lowy D. R., Dvoretzky I., Howley P. M.* (1981). Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2727—2731.
64. *Lazorowitz S. G.* (1982). Simian virus 40 mutant with transposed T-antigen and VPI genes, *J. Virol.*, **41**, 1025—1037.
65. *Lee C. K., Knipe D. M.* (1983). Thermolabile in vivo DNA-binding activity associated with a protein encoded by mutants of herpes simplex virus type 1, *J. Virol.*, **46**, 909—919.
66. *Littlefield J.* (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants, *Science*, **145**, 709—710.
67. *Lo C. W.* (1983). Transformation by iontophoretic microinjection of DNA: Multiple integrations without tandem insertions, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1803—1814.
68. *Lowy D. R., Dvoretzky I., Shober R., Law M.-F., Engel L., Howley P. M.* (1980). In vitro tumorigenic transformation by a defined subgenomic fragment of bovine papilloma virus, *Nature (Lond.)*, **287**, 72—74.
69. *Lusky M., Botchan M.* (1981). Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences, *Nature*, **293**, 79—81.
70. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* (1982). *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
71. *Mann R., Mulligan R. C., Baltimore D.* (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus, *Cell*, **33**, 153—159.
72. *Maxam A. M., Gilbert W.* (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, *Methods Enzymol.*, **65**, 499—560.
73. *McAleer W. J., Buynak E. B., Maigetter R. Z., Wampler D. E., Miller W. J., Hilleman M. R.* (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast, *Nature*, **307**, 178—180.
74. *McCutchan J. H., Pagano J. S.* (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran, *J. Natl. Cancer Inst.*, **41**, 351—356.
75. *McKnight S. L., Kingsbury R.* (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene, *Science*, **217**, 316—324.
76. *Mertz J. E., Berg P.* (1974). Viable deletion mutants of simian virus 40: Selective isolation by means of a restriction endonuclease from *Hemophilus parainfluenzae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4879—4883.
77. *Mertz J. E., Berg P.* (1974). Defective simian virus 40 genomes: Isolation and growth of individual clones, *Virology*, **62**, 112—124.
78. *Messing J., Viera J.* (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either strand of double digest restriction fragments, *Gene*, **19**, 269—278.
79. *Messing J., Crea R., Seeberg P.* (1981). A system for shotgun DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 309—321.
80. *Miele E. A., Mills D. R., Kramer F. R.* (1983). Autocatalytic replication of a recombinant RNA, *J. Mol. Biol.*, **171**, 281—295.
81. *Miyahara A., Toh-e A., Nazaki C., Hamada F., Ohtomo N., Matsubara K.* (1983). Expression of hepatitis B surface antigen in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1—5.
82. *Moar M. H., Campo M. S., Laird A. M., Jarrett W. F. H.* (1981). Persistence of non-integrated viral DNA in bovine cells transformed in vitro by bovine papilloma virus type 2, *Nature (Lond.)*, **293**, 749—751.
83. *Mocarski E. S., Roizman B.* (1982). Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA, *Cell*, **31**, 89—97.
84. *Montell C., Fisher E. F., Caruthers M. H., Berk A. J.* (1982). Resolving the

- functions of overlapping viral genes by site specific mutagenesis at a mRNA splice site, *Nature (Lond.)*, **295**, 380—384.
85. Moriarty A. M., Hoyer B. H., Shih J. W.-K., Hamer D. H. (1981). Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2606—2610.
 86. Mulligan R. C., Berg P. (1980). Expression of a bacterial gene in mammalian cells, *Science*, **209**, 1422—1427.
 87. Mulligan R. C., Howard B. H., Berg P. (1979). Synthesis of rabbit β -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β -globin recombinant genome, *Nature (Lond.)*, **277**, 108—114.
 88. Nakano E., Panicali D., Paoletti E. (1982). Molecular genetics of vaccinia virus: Demonstration of marker rescue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1593—1596.
 89. Ostrowski M. C., Richard-Foy H., Wolford R. G., Bivard D. S., Hager G. L. (1983). Glucocorticoid regulation of transcription at an amplified episomal promoter, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 2045—2057.
 90. Panicali D., Davis S. W., Weinberg R. L., Paoletti E. (1983). Construction of live vaccines by using genetically engineered pox viruses: Biological activity of recombinant vaccinia virus expressing influenza virus hemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5364—5368.
 91. Paoletti E., Lipinskas B. R., Samsonoff C., Meras S., Panicali D. (1984). Construction of live vaccines using genetically engineered pox viruses: Biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 193—197.
 92. Peden K. W. C., Pipas J. M., Pearson-White S., Nathans D. (1980). Isolation of mutants of an animal virus in bacteria, *Science*, **209**, 1392—1396.
 93. Pellicer A., Robins D., Wold B., Sweet R., Jackson J., Lowy I., Roberts J. M., Sim G. K., Silverstein S., Axel R. (1980). Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer, *Science*, **209**, 1414—1422.
 94. Perucho M., Hanahan D., Wigler M. (1980). Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells, *Cell*, **22**, 309—317.
 95. Pipas J. M., Peden K. W. C., Nathans D. (1983). Mutational analysis of simian virus 40 antigen: Isolation and characterization of mutants with deletions in the T-antigen gene, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 203—213.
 96. Pipas J. M., Adler S. P., Peden K. W. C., Nathans D. (1979). Deletion mutants of SV40 that affect the structure of viral tumor antigens, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 285—291.
 97. Post L. E., Mackem S., Roizman B. (1981). Regulation of alpha genes of herpes simplex virus: Expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with alpha gene promoters, *Cell*, **24**, 555—566.
 98. Racaniello V. R., Baltimore D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells, *Science*, **214**, 916—919.
 99. Racaniello V. R., Baltimore D. (1981). Molecular cloning of polio virus DNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4887—4891.
 100. Rassoluzadegan M., Binetruy B., Cuzin F. (1982). High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells, *Nature (Lond.)*, **195**, 257—259.
 101. Reddy E. P., Smith M. J., Aaronson S. A. (1981). Complete nucleotide sequence and organization of the Moloney murine sarcoma virus genome, *Science*, **214**, 445—450.
 102. Reddy V. B., Thimmappaya B., Dhar R., Subramanian K. N., Zain B. S., Pan J., Ghosh P. K., Celina M. L., Weissman S. M. (1978). The genome of simian virus 40, *Science*, **200**, 494—502.
 103. Rigby P. W. J. (1983). Cloning vectors derived from animal viruses, *J. Gen. Virol.*, **64**, 255—266.

104. *Rigby P. W. J.* (1982). Expression of cloned genes in eukaryotic cells using vector system derived from viral replicons. In: *Genetic Engineering*, Vol. 3, ed. by R. Williamson, pp. 83—141, Academic Press, New York.
105. *Roberts T. M., Kacich R., Ptashne M.* (1979). A general method for maximizing the expression of a cloned gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 760—764.
106. *Roberts T. M., Bikel I., Yocum R. R., Livingston D. M., Ptashne M.* (1979). Synthesis of simian virus 40 T-antigen in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5596—5600.
107. *Robins D. M., Ripley S., Henderson A. S., Axel R.* (1981). Transforming DNA integrates into the host chromosome, *Cell*, **23**, 29—39.
108. *Rose J. K.* (1980). Complete intergenic and flanking gene sequence from the genome of vesicular stomatitis virus, *Cell*, **19**, 415—421.
109. *Rose J. K., Bergmann J. E.* (1983). Altered cytoplasmic domains affect intracellular transport of the vesicular stomatitis glycoprotein, *Cell*, **34**, 513—524.
110. *Rose J. K., Bergmann J. E.* (1982). Expression from cloned cDNA of cell-surface and secreted forms of vesicular stomatitis virus in eukaryotic cells, *Cell*, **30**, 753—762.
111. *Rose J. K., Gallione C.* (1981). Nucleotide sequences of the mRNAs encoding the VSV G and M proteins as determined from cDNA clones containing the complete coding regions, *J. Virol.*, **39**, 519—528.
112. *Rose J. K., Shafferman A.* (1981). Conditional expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein gene in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6670—6674.
113. *Sandri-Goldin R. M., Levine M., Glorioso J. C.* (1981). Method for induction of mutations in physically defined regions of the herpes simplex virus genome, *J. Virol.*, **38**, 41—49.
114. *Sandri-Goldin R. M., Goldin A. L., Holland L. E., Glorioso J. C., Levine M.* (1983). Expression of herpes simplex virus β and γ genes integrated in mammalian cells and their induction by an α gene product, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 2028—2044.
115. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463—5467.
116. *Schaffner W.* (1980). Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2163—2167.
117. *Schwarz E., Durst M., Demankowski C., Lattermann O., Zech R., Wolfspenger E., Suhai S., Zur Hausen H.* (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papilloma virus type 6b, *EMBO J.*, **2**, 2341—2348.
118. *Shimotohno K., Temin H. M.* (1981). Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus, *Cell*, **26**, 67—77.
119. *Shinnick T. M., Lerner R. A., Sutcliffe J. G.* (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus, *Nature*, **293**, 543—548.
120. *Shortle D., Nathans D.* (1979). Regulatory mutants of simian virus 40: Constructed mutants with base substitutions at the origin of DNA replication, *J. Mol. Biol.*, **131**, 801—817.
121. *Shortle D., Nathans D.* (1978). Local mutagenesis: A method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2170—2174.
122. *Smith G. L., Mackett M., Moss B.* (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen, *Nature (Lond.)*, **302**, 490—495.
123. *Smith G. L., Murphy B. R., Moss B.* (1983). Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that express the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7155—7159.

124. Soeda E., Arrant J. R., Smolar N., Walsh J. E., Griffin B. E. (1980). Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome, *Nature* (Lond.), **283**, 445—453.
125. Solnick D. (1981). Construction of an adenovirus-SV40 recombinant producing SV40 T-antigen from an adenovirus late promoter, *Cell*, **24**, 135—143.
126. Soprano K. J., Galanti N., Jonak G. J., McKercher S., Pipas J. M., Peden K. W. C., Berseger R. (1983). Mutational analysis of simian virus 40 T-antigen: Stimulation of cellular DNA synthesis and activation of rRNA genes by mutants with deletions in the T-antigen gene, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 214—219.
127. Spaete R. R., Frenkel N. (1982). The herpes simplex virus amplicon: A new eukaryotic defective-virus cloning-amplifying vector, *Cell*, **30**, 295—314.
128. Stow N. D. (1981). Cloning of a DNA fragment from the left-hand terminus in the adenovirus type 2 genome and its use in site-directed mutagenesis, *J. Virol.*, **37**, 171—180.
129. Stow N. D. (1982). The infectivity of adenovirus genomes lacking DNA sequences from their left-hand termini, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 5105—5119.
130. Stow N. D. (1982). Localization of an origin of DNA replication within the TR_s/IR_s repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome, *EMBO J.*, **1**, 863—867.
131. Stow N. D., Subak-Sharpe J. H., Wilkie N. M. (1978). Physical mapping of herpes simplex virus type 1 mutations by marker rescue, *J. Virol.*, **28**, 182—192.
132. Summers W., Grogan E., Sheed D., Robert M., Lui C., Miller G. (1982). Stable expression in mouse cells of nuclear neoantigen after transfer of 3.4-megadalton cloned fragment of Epstein-Barr virus DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5688—5692.
133. Sveda M. M., Lai C.-J. (1981). Functional expression in primate cells of cloned DNA coding for the hemagglutinin surface glycoprotein of influenza virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **7**, 5488—5492.
134. Tabin C. J., Hoffman J. W., Goff S. P., Weinberg R. A. (1982). Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene, *Mol. Cell Biol.*, **2**, 426—436.
135. Thimmappaya B., Weinberger C., Schneider R. J., Shenk T. (1982). Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection, *Cell*, **31**, 543—551.
136. Thummel C., Tjian R., Grodzicker T. (1981). Expression of SV40 T-antigen under control of adenovirus promoters, *Cell*, **23**, 825—836.
137. Valenzuela P., Medina A., Rutter W. J., Ammerer G., Hall B. D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast, *Nature*, **298**, 347—350.
138. Watson R. J., Clements J. B. (1980). A herpes simplex virus type 1 function continuously required for early and late virus RNA synthesis, *Nature*, **285**, 329—330.
139. Wei C.-M., Gibson M., Spear P., Scolnick E. M. (1981). Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the *src* gene of Hervey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1, *J. Virol.*, **39**, 935—944.
140. Weir P. J., Bajsar G., Moss B. (1982). Mapping of the vaccinia virus thymidine kinase gene by marker rescue and by cell-free translation of selected mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1210—1214.
141. Weller S. K., Lee K. J., Sabourin D. J., Schaffer P. A. (1983). Genetic analysis of temperature-sensitive mutants which define the gene for the major herpes simplex virus type 1 DNA-binding protein, *J. Virol.*, **45**, 354—366.
142. Yang R. C. A., Wu R. (1979). BK virus DNA: Complete nucleotide sequence of a human tumor virus, *Science*, **206**, 456—462.

Эпидемиология: механизм возникновения, распространения и передачи вирусных инфекций

Роберт Шоуп¹

В вирусологическом контексте эпидемиология — наука о причинах, распространенности и частоте вирусных болезней, а также о распространении и передаче вирусов, вызывающих заболевание. Вирусы невидимы даже в световой микроскоп. По этой причине они всегда казались таинственными, непонятными и до некоторой степени остались таковыми до сих пор.

Важнее всего то, что вирусы — внутриклеточные организмы; они зависят от живых клеток, снабжающих их основными ферментами и химическими строительными блоками, необходимыми для репликации. Таким образом, сферой обитания вирусов оказывается все растительное и животное царство. Разные семейства вирусов используют разные механизмы для распространения и выживания. Большая часть вирусов имеет в качестве хозяев как позвоночных, так и беспозвоночных, а некоторые заражают как животных, так и растения. В поисках механизмов распространения эпидемиологи концентрируют внимание на человеке, но становится все более и более очевидным, что экология вирусов человека значительно шире. Она охватывает птиц, млекопитающих, рептилий, комаров и клещей. На клеточном уровне она включает множество клеточных структур, в том числе мембраны и нуклеиновые кислоты.

Мы не будем здесь рассматривать общие методы и принципы эпидемиологии. Их можно найти в ряде отличных руководств [7, 10], в которых описываются частота и распространение заболеваний, эпидемиологические исследования, популяционный иммунитет, серологические обследования, пути передачи, инкубационные периоды, патогенез, типы иммунного ответа, клинические синдромы, доказательства причинной связи и методы наблюдения. В наши планы не входит также обсуждение эпидемиологии всех болезней, вызываемых вирусами. В каждой главе, посвященной отдельным вирусам, содержится раздел с подробным

¹ Robert E. Shope, Department of Epidemiology and Public Health, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510.

изложением их эпидемиологических особенностей. Однако в настоящей главе для иллюстрации закономерностей мы приведем несколько примеров.

Методы, используемые в эпидемиологии

Для изучения вирусных болезней эпидемиологи используют вирусологические, серологические, молекулярные и экологические методы. Техника эксперимента становится все более изощренной. Первоначально вирусы различали по болезням, которые они вызывают, таким как желтая лихорадка, грипп, ветрянка или корь. В настоящее время стало очевидно, что вирусов намного больше, чем вирусных болезней. В отличие от бактерий, вирус нельзя увидеть с помощью светового микроскопа. В начале XX в. единственным способом обнаружения вирусов и изучения механизма их передачи были опыты на добровольцах. Именно этим способом Комиссия по изучению желтой лихорадки, возглавляемая Уолтером Ридом, [12], показала, что возбудителем болезни служит вирус. Этот вирус передается не контактным путем, а только с укусами комаров *Aedes aegypti* после инкубации в них. Подобные выводы были сделаны в результате опытов исключительно на людях. Более поздние вирусологические достижения основывались на опытах на лабораторных животных (например, на обезьянах и мышах для желтой лихорадки и мышьях-сосунках для вируса Коксаки). Для большинства вирусных болезней человека и домашних животных было найдено по одному или более лабораторных хозяев. Некоторые вирусы, которые не удавалось вырастить на лабораторных животных, были культивированы *in vitro*. Размножение вирусов полиомиелита [6] и кори [5] в культуре клеток расширило эпидемиологические подходы. Вместе с тем и в настоящее время существует ряд вирусов человека, которые с трудом или вообще не удается размножить (такие как вирус гепатита В), однако эпидемиологические исследования возможны и с этими вирусами благодаря тому, что существуют методы определения антигена [3] и электронной микроскопии [1].

Серологическая эпидемиология

Серология для эпидемиологов почти так же важна, как выявление вируса или антигена. В большинстве случаев сывороточные антитела появляются в течение недели после начала вирусной инфекции, и для их выявления применяют различные серологические тесты (например, нейтрализацию, связывание комплекта, задержку гемагглютинации, иммуноферментный тест). Нейтрализующие антитела, а иногда и антитела других типов

обычно сохраняются в течение всей жизни. Существует множество примеров использования серологической эпидемиологии. В 1930 г. на карту было нанесено распространение в мире желтой лихорадки, установленное тестированием человеческих сывороток методом нейтрализации на мышах [16]. С помощью нейтрализации в культуре ткани было показано, что существует только 3 серотипа вируса полиомиелита. Благодаря этому открытию была создана тривалентная вакцина против полиомиелита. Это только один из многочисленных примеров, приведенный здесь для того, чтобы показать читателю особую важность применения серологических методов в эпидемиологии.

Молекулярная эпидемиология

В течение последнего десятилетия молекулярные методы развились до такой степени, что теперь их можно применять для решения эпидемиологических проблем. Благодаря этим методам эпидемиологи расширили свои возможности в обнаружении вирусных антигенов и нуклеиновых кислот и смогли с большей специфичностью идентифицировать антитела, антигены или нуклеиновые кислоты.

Моноклональные антитела обладают исключительной специфичностью. Их получают путем гибридизации секретирующих иммуноглобулины клеток миеломы с клетками селезенки, которые определяют специфичность иммуноглобулинов. Моноклональные антитела можно использовать для быстрого и четкого различения родственных вирусов, например HSV-1 и HSV-2. Изготавливая антитела к моноклональным антителам, получают чрезвычайно специфический антигеноподобный реагент, называемый «антиидиотипическими» антителами [11].

Эпидемиологи часто сталкиваются с необходимостью выявления среди множества вирусных штаммов одного, ответственного за конкретный случай инфекции или за вспышку. Например, как выяснить, произошло ли заражение младенца вирусом во время прохождения родовых путей матери или инфекцию распространили обслуживающие отделение для новорожденных врачи и медицинские сестры? Для нахождения ответа у ребенка, матери и обслуживающего персонала выделяют штаммы вирусов, нуклеиновые кислоты которых могут быть исследованы высокоспецифическими методами. Для ДНК-содержащих вирусов используют рестрикционные эндонуклеазы — бактериальные ферменты, которые расщепляют ДНК в участках, содержащих короткие специфические нуклеотидные последовательности. Анализ фрагментов ДНК позволяет распознавать различия в последовательностях ДНК, составляющие менее 0,2% азотистых оснований [14].

Аналогичным методом, называемым «олигонуклеотидные отпечатки пальцев», можно провести картирование РНК после ее расщепления рибонуклеазой T1 и двумерного электрофореза. Вирусы, содержащие двухцепочечную РНК, такие как ротавирусы, можно анализировать более простыми методами, так как их РНК представлена сегментами, являющимися индивидуальными генами. Эти гены мигрируют в геле с характерной подвижностью, зависящей от молекулярной массы и конфигурации. Гибридизация нуклеиновых кислот — еще более фундаментальный и потенциально очень чувствительный молекулярный метод обнаружения и идентификации тонких межштаммовых различий вирусов. Молекулярная техника для тонкого распознавания отдельных штаммов вирусов существует практически для каждого семейства вирусов. Используя этот набор методов, удалось раскрыть ранее неизвестные способы распространения и жизненные циклы многих вирусов.

Экологическая эпидемиология

Передача вирусов зависит от взаимодействия вирусов и хозяина, на которое в свою очередь влияют поведение хозяина и окружающая среда. Часто мы начинаем разбираться в способах передачи вируса только после того, как проявляются некоторые аспекты экологии человека и животных.

Примеры:

1. В Азии мать жует пищу для своего ребенка и передает ему со слюной вирус гепатита В.

2. Владельцы домов в Боливии распыляют ДДТ для предотвращения малярии, ДДТ убивает домашних кошек и поэтому в дома проникают дикие крысы. Крысиная моча содержит вирус Мачупо, вдыхание которого вызывает у населения боливийскую геморрагическую лихорадку.

3. Отец сооружает для своего ребенка качели из резиновой покрышки, комары откладывают в покрышку яйца, содержащие вирус Ла Кросс, потомство комаров передает вирус ребенку и он заболевает энцефалитом Ла Кросс.

Экологическое окружение каждого вируса различно и это почти безграничное разнообразие составляет главную особенность эпидемиологии. Даже когда мы думаем, что понимаем и изменяем экологию, желая предотвратить распространение вируса, последний в свою очередь может измениться и адаптироваться, сводя на нет наши усилия. В некоторых случаях мы обнаруживаем, что передача происходит более сложно, чем мы предполагали. В этих явлениях нет ничего нового. В 1928 г., когда благодаря сдерживанию размножения комаров *Aedes aegypti* была остановлена передача желтой лихорадки в городах Амери-

ки, казалось, что болезнь побеждена. Однако после жестокой эпидемии в Рио-де-Жанейро, был обнаружен лесной цикл вируса желтой лихорадки, в котором участвуют обезьяны и комары *Haemagogus*. Этот случай научил искать альтернативные и более сложные циклы и у других вирусов.

Многие циклы передачи вирусов у людей подобны таким циклам у других позвоночных. Использование модельных инфекций на животных позволяет эпидемиологам ставить экологические опыты, которые обычно невозможно провести на людях. Вместе с тем у животных существует ряд инфекций, для которых у человека еще не обнаружено аналогов. Наглядным примером являются опухолеродные вирусы. Два десятилетия назад у птиц и млекопитающих было известно около 20 ассоциируемых с вирусами видов опухолей. Для большей части этих опухолей существуют аналоги у человека, но в настоящее время мы все еще не понимаем причин, вызывающих у него их появление.

Биттнеровский агент карцином молочных желез [2] у определенных штаммов мышей передается с молоком и присутствует в других органах. Вскормленное потомство несет в себе потенциальную возможность развития рака молочных желез того же клеточного типа, что был у матери. Опухоль развивается не у каждой мыши, но способность к передаче опухоли своему потомству сохраняется в следующих поколениях. Рак молочных желез развивается в определенном возрасте при характерном гормональном статусе и, как правило, ведет к гибели животного.

Вирус лейкоза мышей Гросса [8] передается от матери потомству через эмбрион, очевидно, генетическим путем. Для проявления канцерогенеза требуется от 4 до 12 месяцев. Если аналогичные опухоли человека имеют такой же механизм передачи, то для установления связи заболевания с вирусами опухолей человека могут потребоваться поколения. Однако в получении более быстрого ответа на эти вопросы может помочь изучение экологических взаимодействий.

Мы постоянно сталкиваемся с тем, что, для того чтобы вызвать, распространиться и вызвать заболевание, вирусы используют удивительные механизмы, часто очень сложные и изощренные. Ниже рассмотрены некоторые из этих механизмов.

Модели инфекции

Функционирование одних вирусов можно смоделировать с помощью довольно простых эпидемиологических механизмов, других — с помощью более сложных, но вряд ли природа создала механизм, который бы использовался только в одном случае, поэтому иногда имеет смысл искать другие примеры, уклады-

Таблица 9.1. Эпидемиологические модели некоторых вирусных болезней

Механизм передачи	Болезнь или вирус
<i>Человек — человек</i> Воздушно-капельный	Корь, оспа, ветрянка, грипп, цитомегаловирус
Алиментарный	Полиомиелит, гепатит А, аденовирусы, ротавирусы, норуковский агент
Водный	Гепатит А, аденовирус
Половой	Гепатит В, HSV-2, Т-клеточная лимфома человека
Через хирургические инструменты, иглы	Бешенство, гепатит В, Т-клеточная лимфома человека
Рука — рот, рот — рот	HSV-1, вирус Эпштейна — Барр
Рука — нос, рука — конъюнктив	Риновирусы
<i>Человек (носитель) — человек</i>	Гепатит В, ветрянка — опоясывающий лишай
<i>Членистоногие — человек</i> Членистоногие	Вирус денге
<i>Членистоногие от животных</i> Членистоногие	Желтая лихорадка, японский энцефалит, венесуэльский энцефалит, энцефалит Сан-Луи
<i>Трансовариальная у членистоногих</i> Комары	Энцефалит Ла Кросс
Клещи	Клещевой энцефалит
<i>Животное — животное, человек — случайный хозяин</i> Капельный	Хантаан, бешенство, аренавирусы
Через укус	Бешенство
<i>Человеческий резервуар</i> С другим вирусом, необходимым для репликации	Дельта-агент

вающиеся в уже имеющуюся модель. В табл. 9.1 приведены примеры нескольких моделей и вирусы, которые иллюстрируют каждую из них.

Прямая передача от человека к человеку

Распространение вирусов между отдельными людьми может происходить воздушно-капельным путем, алиментарным, водным, половым, инъекционным, контактным, со слюной или слезой (рукой в рот, рукой в нос или рукой на конъюнктиву). По способности заражать хозяина вирусы сильно различаются. Например, корь высоко контагиозна, тогда как паротит значительно менее контагиозен.

Все более очевидной при передаче вирусов становится критическая роль рук, например в случае HSV-1, когда мытье рук может препятствовать его распространению, или риновирусов, которые могут распространяться при контакте рука—нос или рука—конъюнктив [9], и вероятность передачи при этом вируса очень велика.

В развитых странах передача вируса Эпштейна—Барр среди молодежи происходит главным образом при поцелуях. Вирус находится в слюне и слизи ротовой полости и при близком контакте легко передается. Вместе с тем лица, живущие в одной комнате с больным моноклеозом, активно выделяющим вирус, заражаются нечасто [15], что указывает на низкую способность этого вируса к передаче аэрозольным путем.

Большинство вирусных болезней, распространяющихся от человека к человеку — быстротекущие острые инфекции с пожизненным или по крайней мере многолетним иммунитетом. Однако последние данные о ротавирусах указывают на то, что повторное заражение тем же самым серотипом не только обычно, но может сопровождаться рецидивом болезни. Такая эпидемиологическая особенность может быть серьезным препятствием для эффективной вакцинации.

Вирусные инфекции передаются также половым путем. В последние годы этот механизм либо становится все более распространенным, либо все лучше выявляется. HSV-2, например, стал эпидемическим среди молодежи. Высок риск передачи вируса гепатита В среди гомосексуалистов, так как их сексуальная практика сопровождается травмами, кровотечениями и открытыми ранами.

Передача от человека к человеку вируса от носителей

Большинство примеров передачи, использованных нами, — это передача от больных, активно выделяющих вирус, или от больных с виремией. Многие вирусные инфекции, однако, характеризуются тем, что после выздоровления или после инapparантной первичной инфекции развивается персистенция вируса, иногда только у небольшого количества больных. Вирус может сохраняться месяцами или годами в латентной или персистирующей форме, не распространяясь и не вызывая никакого болезненного эффекта у своего носителя. Вирус ветряной оспы вызывает в детском возрасте ветрянку, заканчивающуюся обычно полным выздоровлением. Однако вирус остается в организме и иногда спустя годы вновь проявляется в форме опоясывающего лишая. Индуктором такого повторного проявления болезни может быть угнетение клеточной иммунной системы, иногда связанное с опу-

холями, особенно если они локализируются в иммунной системе. Вирус опоясывающего лишая идентичен вирусу ветряной оспы. Больные опоясывающим лишаем заразны и могут передавать вирус неиммунным контактным лицам, у которых развивается ветряная оспа.

Другие вирусы персистируют явно, т. е. они остаются и размножаются в организме в течение длительного периода. В любое время в крови 0,1—20% населения можно обнаружить антиген гепатита В. В отсталых странах наблюдается еще более высокий процент. Среди носителей преобладают лица, инфицированные в раннем периоде жизни. Кровь многих из них содержит вирус, который способен передаваться при уколах или хирургических операциях. Такое заражение может происходить также при хроническом гепатите.

Передача членистоногими

Установлено по крайней мере три механизма передачи вирусов членистоногими. Первый — передача комар—человек—комар иллюстрируется на примере вируса денге, который сохраняется в *Aedes aegypti*. Эти тропические и субтропические комары размножаются в домах или около них и служат очень хорошим переносчиком вируса денге. Содержание вируса в крови зараженного человека достигает уровня $\lg \text{ИД}_{50} = 7$ в 1 мл и более; этого вполне достаточно для того, чтобы заразилась большая часть комаров, кормившихся на этом человеке. Вирус заражает клетки кишечника переносчика, и после внешней (по отношению к человеку) инкубации (обычно около недели) комар приобретает способность передавать вирус неиммунному лицу, вводя содержащую вирус слюну во время высасывания крови.

Второй, более распространенный механизм — это передача по схеме членистоногие — дикие животные — членистоногие. При этом зараженные членистоногие передают вирус человеку при контакте с ним, как случайному хозяину. В Северной Америке энцефалит Сан-Луи циркулирует между комарами *Culex* и птицами. Человек иногда заражается комарами, но развивающаяся у него вирусемия недостаточно высока для поддержания циркуляции вируса. Такого хозяина называют тупиковым. Птицы не заболевают, но у них развивается вирусемия, достаточная для того, чтобы инфицировать других комаров и таким образом расширить циркуляцию.

В третьем механизме членистоногие являются основным резервуаром, в нем не требуется позвоночный хозяин, содержащий вирус в крови. Вирус передается через яйца, т. е. трансовариально. Как и во втором механизме, человек заражается при проникновении в экологическую нишу, где его могут случайно

укусить членистоногие. При этом человек оказывается тупиковым хозяином, несущественным для поддержания цикла. Энцефалит Ла Кросс интенсивно изучали в Висконсинском университете, департаменте здравоохранения шт. Висконсин и центре по контролю заболеваний [4]. Вирус сохраняется в комарах *Aedes triseriatus*, живущих в дуплах деревьев лиственных лесов штатов Висконсин, Айова, Миннесота, Огайо, Индиана и Нью-Йорк. Инфицированные яйца откладывает только небольшой процент самок, но почти все их потомство заражено. Обнаружено также, что трансовариально зараженные комары-самцы могут передавать вирус самкам, увеличивая таким образом способность вируса к выживанию.

Вирус Ла Кросс заражает также бурундуков и белок, у которых развивается виремия, достаточная для расширения циркуляции. Точная потребность в таком расширении для выживания вируса не определена.

Зоонозная инфекция с передачей вируса от животного человеку

Болезни животных иногда передаются непосредственно человеку аэрозольным путем, через загрязненную пищу, при укусе животного. В случае когда животное является здоровым носителем, вирус попадает в его организм, как правило, в раннем периоде жизни и затем выделяется периодически или постоянно. В некоторых случаях животное не образует гуморальных антител, т. е. является иммунотолерантным. Примером описанной выше инфекции служат аренавирусы, такие как вирусы лимфоцитарного хориоменингита, Хунин и Мачупо. Они циркулируют у грызунов, которые заражаются *in utero* или при рождении. У животных, зараженных в позднем периоде жизни, формируются антитела, и вирус обычно не выделяется. Люди заражаются при вдыхании пыли, загрязненной мочой грызунов, или при употреблении аналогичным образом загрязненной пищи.

Вирус Хантаан, вызывающий геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, также передается с мочой, легочным секретом или слюной грызунов. Как и в случае аренавирусов, грызуны не болеют, но выделяют вирус в течение всей жизни или по крайней мере в течение длительного периода. В отличие от аренавирусов Нового Света вирус Хантаан индуцирует у зараженных животных образование антител, но выделение вируса продолжается.

Еще одним примером непосредственной передачи зоонозного вируса от животного человеку является бешенство. В этом случае животное заражается обычно путем укуса другого животного и после длительного инкубационного периода заболевает. Бо-

лезнь может развиваться в форме паралича (немое бешенство), но чаще встречается буйное бешенство, при котором затронута лимбическая система мозга, и животное в припадке ярости, гонимое лимбическим возбуждением, кусает всех без разбора. В слюне животного вирус присутствует в высокой концентрации и легко передается с укусами. У людей обычно бывает паралитическая форма болезни, и они почти никогда не кусают окружающих (тупиковая инфекция).

Передача, для которой в человеческом резервуаре необходим другой вирус

В 1977 г. был обнаружен антиген [13], ассоциирующийся со скоротечными случаями гепатита В. Сначала он был назван дельта-антигеном, а впоследствии выяснилось, что этот белок входит в состав дефектного вируса, причем РНК-содержащий геном этого вируса нуждается для своей репликации в вирусе гепатита В. Геном указанного дефектного вируса (дельта-агента) покрыт поверхностным антигеном гепатита В и реплицируется только в присутствии вируса гепатита В (или близко родственного вируса гепатита сурков). Он может быть передан другому с кровью и другими тканевыми жидкостями вместе с вирусом гепатита В, а носителю гепатита В — сам по себе. Эволюционный источник этого необычного агента неизвестен.

Происхождение новых вирусов

Новые вирусы появляются постоянно. Большая часть их, вероятно, не представляет собой действительно новые вирусы, а только теперь выявляется. В случае ассоциации с новой болезнью появление новых вирусов можно объяснять одним из четырех механизмов: а) изменением экологии местности; обычно это связано с началом сельскохозяйственных работ или войной, когда люди вынуждены контактировать с переносчиками или временными хозяевами вирусов; б) попаданием неиммунных лиц в район, где местное население иммунизировано в детском возрасте; в) изменениями в вирусе, связанными с обменом генами с вирусами растений, насекомых или диких животных, и г) появлением новых стабильных мутантов предсуществующих вирусов.

Сейчас стало известно много новых болезней, которые появились в связи с изменением экологии. Крымская геморрагическая лихорадка была впервые описана в 1943 г., когда солдаты и переселенцы прибыли в Крым с целью освоения новых земель для земледелия. Вспаханные после долгого перерыва поля были подходящим местом для выведения переносчика, клеща *Hyalomma*, который в идеальных экологических условиях обильно раз-

множился. Аргентинская геморрагическая лихорадка, вызываемая вирусом Хунин, впервые зарегистрирована в начале 1950-х гг., когда большие площади были засеяны кукурузой к северу от Буэнос-Айреса. Эти плантации благоприятствовали увеличению выплода и выживания грызунов *Calomys* — резервуара вируса Хунин. Данные болезни почти достоверно не являются новыми. Наиболее вероятно, что они были эндемичными в этом районе, но количество случаев было ниже порога регистрации.

Попадание неиммунных взрослых людей в эндемическую зону неизбежно ведет к появлению новых болезней. Когда войска союзников вступили в Неаполь и высадились на Сицилии во время второй мировой войны, москитная лихорадка внезапно разразилась в эпидемических масштабах. Эта новая для американских врачей болезнь была хорошо известна в Европе.

В течение десятилетий не был ясен источник новых серотипов вируса гриппа. Пандемия 1918 г. возникла внезапно из невыясненного источника, и каждые последующие 10—15 лет появлялись новые серотипы вируса гриппа. РНК вируса гриппа состоит из нескольких сегментов, которые в клетках, коинфицированных различными штаммами, подвергаются обмену (реассортации). В этом процессе гены одного вируса смешиваются с генами другого, в результате чего образующееся потомство получает генетический материал из обоих источников. Вследствие этого процесса возникают заметные изменения в антигенном составе преобладающего штамма вируса гриппа. Эти изменения называют антигенным сдвигом. Источник новых сегментов теоретически может быть прослежен путем сравнения подвижности вирусных генов из различных источников с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Одна из современных гипотез предполагает происхождение нового генетического материала из вирусов диких животных и особенно из вирусов птиц.

Однако есть вирусы, происхождение которых не укладывается ни в один из изложенных выше механизмов появления новых вирусов. Вирус Росио вызвал большой взрыв энцефалита в штате Сан-Паулу (Бразилия) в 1975—1976 гг. Вирус Росио относится к флавивирусам из семейства тогавирусов. Его появление было внезапным и, видимо, так же внезапно он уже исчез. Вирус Марбург был ответствен за вспышку геморрагической лихорадки в Марбурге (Германия) в 1967 г. в группе работников, готовящих вакцину против полиомелита на почках африканских зеленых марышек. Обезьяны происходили из Уганды, и вирус также мог быть занесен оттуда. Экология этого вируса остается загадкой. В качестве третьего примера рассмотрим вирус О'ньонг-ньонг — альфавирус, переносимый *Anopheles*. Этот вирус в 1959 г. вызвал в Восточной Африке внезапно на-

чинающуюся острую болезнь суставов, которая сопровождается лихорадкой, а 3 года спустя снова исчез. Теоретически возможно, что эти примеры представляют собой истинные мутации с изменением патогенности для человека, но в настоящий момент это предположение остается чисто умозрительным.

Некоторые из вирусов появляются и исчезают, очевидно, будучи не в состоянии выжить; возможно, они все еще передаются, но на уровне, который невозможно зарегистрировать. Для того чтобы выжить, вирус должен найти долгосрочный резервуар. После пандемии 1918 г. у свиней появилось новое заболевание — грипп свиней. Существует достаточно доказательств, что человеческий вирус проник в популяцию свиней и что сегодняшний вирус свиного гриппа — это результат либо реассортации с участием пандемических штаммов человека, либо адаптации человеческого вируса к свиньям.

Вирус может не выживать на новой территории по ряду причин. Обычно это связано с отсутствием соответствующего резервуара в виде позвоночного или беспозвоночного хозяина. Однако в некоторых случаях резервуар имеется, а вируса нет. Примером может служить желтая лихорадка, отсутствующая в Юго-Восточной Азии. Предложены различные объяснения: вирус денге интерферирует с вирусом желтой лихорадки в организме комаров; переносчик, имеющийся в Юго-Восточной Азии, некомпетентен; иммунитет к другим флавивирусам предотвращает заражение человека желтой лихорадкой. Ни одно из этих объяснений не удовлетворяет полностью. Интерференция имеет место, но абсолютное количество зараженных вирусом денге комаров незначительно, и интерференция также должна быть незначительной. Иммунитет к вирусу денге снижает виремию, но не предотвращает заражения. В некоторых экспериментах компетентность переносчиков из Юго-Восточной Азии была меньше, чем у комаров латиноамериканских штаммов, но эти эксперименты также нельзя считать полностью удовлетворительными, так как часть популяции переносчиков из Юго-Восточной Азии все-таки чувствительна к лабораторному заражению вирусом желтой лихорадки.

Мы еще многого не знаем об экологии, механизмах передачи и выживания вирусов. Область экологии вирусов, как было отмечено 20 лет назад [17], представляет собой белое пятно нашего образования. Студенты, начинающие научную карьеру, становятся либо специалистами по общей биологии, либо вирусологами. Сегодня, как и прежде, нам нужны лица, обученные и сведущие в обеих областях. Особенно нужны исследователи, владеющие новейшими методами молекулярной биологии, которые могут применить эти методы для изучения вирусов в переносчиках и диких животных (позвоночных), являющихся их

хозяевами. Наши знания по эпидемиологии вирусов все еще недостаточны, но возможности в этой области необъятны и крайне заманчивы.

Литература

1. Almeida J. D., Rubenstein D., Stott E. J. (1971). New antigen-antibody system in Australian-antigen-positive hepatitis, *Lancet.*, 2, 1225—1227.
2. Bittner J. J. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice, *Science*, 84, 162.
3. Blumberg B. S., Gerstley B. J. S., Hungerford D. A., London W. T., Sutnick A. I. (1967). A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis, *Ann. Intern. Med.*, 66, 924—931.
4. Calisher C. H., Thompson W. H., eds. (1983). *California Serogroup Viruses*, Alan R. Liss, New York.
5. Enders J. F., Peebles T. C. (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86, 277—286.
6. Enders J. F., Weller T. H., Robbins F. C. (1949). Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues, *Science*, 109, 85—87.
7. Evans A. S. (1982). *Viral Infections of Humans*, Plenum, New York.
8. Gross L. (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with Ak-leukemic extracts, or Akembryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76, 27—32.
9. Hendley J. O., Wenzel R. P., Owaltney J. M., Jr. (1973). Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation, *N. Engl. J. Med.*, 288, 1361—1364.
10. Lilienfeld A. M., Lilienfeld D. E. (1980). *Foundations of Epidemiology*, Oxford University Press, Oxford.
11. Nepom J. T., Weiner H. L., Dichter M. A., Tardieu M., Spriggs D. R., Gramm C. F., Powers M. L., Fields B. N., Greene M. I. (1982). Identification of a hemagglutinin-specific idiotype associated with reovirus recognition shared by lymphoid and neural cells, *J. Exp. Med.*, 155, 155—167.
12. Reed W., Carroll J., Argamonte A., Lazear J. (1911). Yellow fever, a compilation of various publications, Senate Documents, 66, 156 (Washington, D. C.).
13. Rizzetto M., Canese M. G., Arico S., Grivelli O., Bonino F., Trpo C. G., Verme G. (1977). Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to the hepatitis B virus in tee liver and in serum of HBsAg carriers, *Gut.*, 18, 997—1003.
14. Roizman B., Buchman T. (1979). The molecular epidemiology of herpes simplex viruses, *Hosp. Pract.*, 14, 95—104.
15. Sawyer R. N., Evans A. S., Niederman J. C., McCollum R. W. (1971). Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis, *J. Infect. Dis.*, 123, 263—269.
16. Sawyer W. A., Bauer J. H., Whitman L. (1937). The distribution of yellow fever immunity in North America, Central America, the West Indies, Europe, Asia and Australia, with special reference to the specificity of the protection test, *Am. J. Trop. Med.*, 17, 137—161.
17. Shope R. E. (1965). Transmission of viruses and epidemiology of viral infections. In: *Viral and Rickettsial Infections of Man*, 4th ed., edited by F. L. Horsfall Jr. and I. Tamm, pp. 385—404, Lippincott, Philadelphia.

Патогенез вирусных инфекций

Роберт С. Кауфман и Бернارد Н. Филдс¹

Достижения последних 20 лет способствовали выяснению деталей биохимических механизмов внутриклеточной репликации вирусов. Были проведены широкие исследования таких явлений, как адсорбция вирусов на поверхности клеток, последующий захват и раздевание вирусов, сменяющиеся экспрессией и репликацией вирусного генетического материала и продукцией вирионов потомства. Интенсивно изучалась также интеграция вирусного генетического материала с геномом клетки-хозяина, сопровождающаяся клеточной трансформацией. Однако изучение патогенеза вирусных инфекций еще не достигло такого же уровня детализации. Вместе с тем недавние исследования свидетельствуют о возможности применения генетических и биохимических методов для решения проблем вирусного патогенеза, что, вероятно, позволит разобраться в них так же детально, как и в вопросах, связанных с репликацией вирусов. В настоящее время совершенно ясно, что такие исследования — необходимое условие для дальнейшего продвижения вперед, а также разработки новых подходов в противовирусной стратегии и новых приемов воздействия на вирусы с целью изменения исхода болезни.

В ранних руководствах, посвященных вирусным болезням, излагалось много общих механизмов, участвующих в патогенезе вирусных инфекций, но приводилось очень мало конкретных экспериментальных данных, подтверждающих обоснованность постулированных механизмов. В настоящее время накоплено достаточное количество экспериментальных данных и клинических наблюдений, и для иллюстрации представленных здесь общих концепций могут быть использованы конкретные примеры, свидетельствующие об успехах, достигнутых в этой области за последние 15—20 лет. Мы использовали характерные приме-

¹ *Robert S. Kauffman*, Charles A. Dana Research Institute and Harvard Thorndike Laboratory of Beth Israel Hospital, Department of Medicine (Infectious Diseases), Beth Israel Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215.

Bernard N. Fields, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, and Department of Medicine (Infectious Diseases), Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02215.

ры молекулярных и генетических исследований, чтобы проиллюстрировать множество общих стратегий, которые используются вирусами для того, чтобы вызвать болезнь; однако мы не пытались сделать в этой главе обзор, охватывающий всю литературу по вирусному патогенезу.

Для того чтобы начать заражение и вызвать заболевание, вирус должен проникнуть в организм хозяина и вступить в контакт с чувствительными тканями и клетками. В результате реплицируется вирус и повреждаются клетки, что и лежит в основе клинического проявления болезни, вызываемой вирусами. Кроме того, необходимо, чтобы в это время вирус сумел избежать действия хозяйских защитных факторов, правда, в некоторых случаях защитная система хозяина даже способствует развитию болезни. Одни вирусы, такие как вирус гриппа и другие респираторные вирусы, реплицируются и вызывают клинические проявления в месте проникновения, в респираторном эпителии; другие — такие как вирус полиомиелита и прочие энтеровирусы — проникают в организм хозяина через пищеварительный тракт, а затем должны распространиться на другие органы, в частности на нервную систему, где они и вызывают проявление главных клинических симптомов болезни. За клинические проявления паралитического полиомиелита ответственна репликация вируса в клетках, удаленных от места проникновения, например в клетках передних рогов спинного мозга в случае полиомиелита. Таким образом, исход инфекции и способность вирусов вызвать заболевание определяются взаимодействием многих хозяйских и вирусных факторов. Именно понимание этих факторов на генетическом и биохимическом уровнях служит целью проводимых в этой области исследований, которые и будут суммированы в настоящей главе.

Общие принципы вирусного патогенеза

Схема, первоначально предложенная Феннером [33] и Мимсом [92] (суммированная в табл. 10.1), представляет собой хорошо обоснованное и удобное изложение стадий вирусного патогенеза; ее можно применить также ко всем видам микробного патогенеза. В правом столбце таблицы перечислены события, происходящие внутри клетки с момента начала заражения. Эти внутриклеточные стадии репликации вирусов в конечном счете определяют судьбу зараженной клетки, т. е. ведут к ее гибели; клеточной трансформации, характеризующейся снятием ограничения роста; персистентной или латентной инфекции. В левом столбце приведены события на уровне организма или ткани, ведущие к заражению клеток и включающие иммунный ответ хозяина. Эта схема упрощена и идеализирована в том смысле,

Таблица 10.1. Хозяйские и клеточные стадии вирусного патогенеза¹

Организм хозяина	Клетка
Проникновение вируса в хозяина Первичная репликация Распространение вируса внутри хозяина Клеточный и тканевой тропизм и клеточные рецепторы Повреждение клеток Иммунный ответ и другие защитные факторы хозяина Персистенция вируса, латентность и медленные вирусные инфекции	Адсорбция Проникновение Разделение Транскрипция Трансляция Сборка вируса Выход из клетки

¹ Из [124 а] с некоторыми модификациями.

что не все вирусы используют все эти стадии каждый раз, когда они заражают своего хозяина; многое зависит от специфики вируса и хозяина, что будет детально обсуждаться ниже. Стадии, представленные в табл. 10.1, будут рассмотрены в последующих разделах этой главы.

Вызываемое вирусом развитие клинических проявлений болезни есть конечный результат множества событий, тогда как большая часть процессов, связанных с репликацией вируса, может происходить без каких-либо расстройств в организме хозяина до начала клинических проявлений болезни. Эта особенность, характерная для многих системных вирусных инфекций и впервые четко описанная Феннером при экспериментальном заражении вирусом оспы мышей [33], представляют собой важнейшую концепцию для понимания вирусного патогенеза и разработки противовирусной стратегии. Кроме того, часто встречается иннаппарантная вирусная инфекция и поэтому развитие клинических проявлений болезни в зараженном организме — далеко не всегда чувствительный индикатор предшествующих им интенсивной репликации и распространения вируса в организме, а также формирования противовирусного иммунитета. Активная или пассивная иммунизация может предотвратить клинические проявления болезни, вызываемой вирусом, но она может не предотвратить заражение и интенсивное распространение вируса в организме хозяина. Парадоксально, но в некоторых случаях в результате усилий, направленных на защиту хозяина, болезнь протекает тяжелее, чем можно было бы ожидать для естественного течения инфекции; мы обсудим это позже, хотя механизмы этих эффектов еще не полностью выяснен. Указанные факты делают чрезвычайно ценным для изучения вирусного патогенеза моделирование человеческой инфекции на животных, так как при таком моделировании появляется возможность изучать ран-

ние стадии заражения, предшествующие проявлению болезни, и осуществлять тонкие манипуляции с иммунной системой. Значительная часть наших знаний о патогенезе вирусов получена именно на модельных системах.

Специфические стадии вирусного патогенеза

Проникновение вируса в организм хозяина

За исключением вирусов, проникающих в организм хозяина при прямой инокуляции в кровь, таких как вирус гепатита В и многие из тога- и буньявирусов, передающихся членистоногими, большая часть вирусов проникает в организм хозяина через барьеры слизистых дыхательных путей и пищеварительного тракта. Для вирусов, вызывающих заболевание в месте проникновения, для которых не характерно дальнейшее системное распространение, таких как вирусы гриппа (респираторный) и ротавирусы (желудочно-кишечный), проникновение, продвижение к органам-мишеням и первичная репликация могут рассматриваться как одна стадия, хотя каждую из ее ступеней могут регулировать различные вирусные и хозяйские факторы. Однако вирусы, ответственные за болезни в отдаленных от входных ворот местах, должны проникать через барьер слизистых оболочек и распространяться в организме хозяина к этим местам, где происходит репликация вируса. К ним относятся, например, энтеровирусы (проникновение через пищеварительный тракт, проявления болезни в центральной нервной системе) или вирус ветрянки (проникновение через дыхательные пути, генерализованная инфекция с проявлением болезни на коже). Поверхность слизистых оболочек обычно защищена внушительным рядом неспецифических хозяйских защитных факторов, таких как протеолитические ферменты, слизь, соли желчных кислот. Для того чтобы заразить клетку, вирусы должны обладать резистентностью к этим агентам. Так, кишечные вирусы обычно устойчивы к кислым рН, к детергентному действию солей желчных кислот и к разрушению протеолитическими ферментами. Возможность изменения способности вирусов вызывать инфекцию под влиянием указанных факторов показана в опытах с заражением реовирусом новорожденных мышей через кишечник. Вирионы штамма Диринг реовируса типа 3 инактивируются *in vitro* при обработке химотрипсином — протеолитическим ферментом, найденным в секрете кишечника, тогда как реовирус типа 1 при этом не инактивируется [114]. Соответственно реовирус типа 3 не способен реплицироваться в пищеварительном тракте новорожденных мышей, а вирус типа 1 способен [114]. Заражение мышей генетическими реассортантами, содержащими смесь генов этих

двух серотипов, и изучение инаktivации их химотрипсином *in vitro* свидетельствует о том, что наличие в реассортантах гена М2 из вируса типа 1, кодирующего один из вирусных наружных капсидных белков, коррелирует как с резистентностью вирионов к химотрипсину *in vitro*, так и с их способностью к репликации *in vivo* [114]. Таким образом, ген М2 детерминирует вирулентность реовируса, регулируя выживаемость вируса на барьере слизистой оболочки.

Вирус полиомиелита проникает через барьер слизистой кишечника на ранних стадиях заражения перед системным распространением и накапливается в пейеровских бляшках [12]. Недавние исследования с использованием реовирусов млекопитающих обнаружили специфическую клеточную основу этого пути проникновения. Специализированные эпителиальные клетки кишечника, имеющиеся в слизистой, выстилающей пейеровские бляшки, называют М-клетками или клетками кишечных микро складок [143]. Они захватывают частицы и белковые агрегаты и транспортируют их в систему вакуолей в клетках лимфоидных фолликулов, расположенных на наружной поверхности кишечника [143]. Реовирусы типа 1 и 3 связываются с поверхностью М-клеток, захватываются везикулами и затем транспортируются через М-клетки, для того чтобы вступить в контакт с мононуклеарными клетками лимфоидных фолликулов, расположенными под М-клетками (рис. 10.1) [144]. Таким образом, эти клетки обеспечивают специфический прямой путь проникновения вируса через слизистую и раннее взаимодействие с локальной иммунной системой. Вероятно, другие вирусы, проникающие через пейеровские бляшки и распространяющиеся по системам организма, используют аналогичный клеточный путь проникновения в организм хозяина. М-клетки были найдены также в слизистой эпителия дыхательных путей, выстилающего миндалины, и ассоциированной с бронхами лимфоидной ткани [143]. Хотя нет сообщений об изучении взаимодействия вирусов с клетками последнего типа, эти клетки также могут обеспечивать путь системного распространения для вирусов, проникающих в организм хозяина через дыхательные пути.

Первичная репликация

Многие вирусы, прежде чем распространиться по системам, реплицируются в месте первичного проникновения в организм хозяина. Вирус экстремелии (оспы мышей) перед системным распространением через кровеносную систему реплицируется в коже в месте инокуляции, а затем в региональных лимфатических узлах [33, 92], где прежде всего инфицируются макрофаги [92]. При заражении вирусом полиомиелита первичная репликация

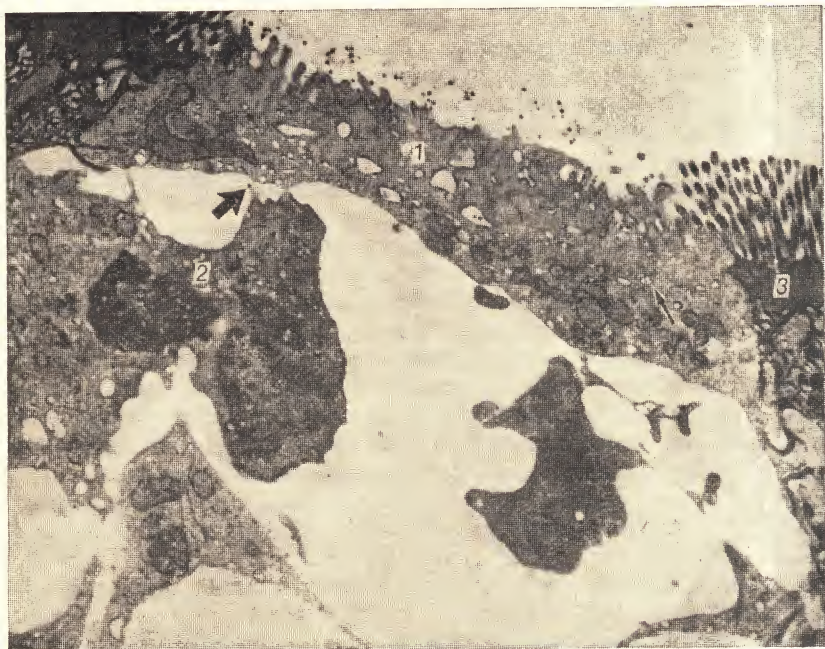


Рис. 10.1. Эпителий, покрывающий пейеровские бляшки 10-дневных мышей СЗН/НеJ, полученный через 1 ч после заражения реовирусом типа 1. Видны вирионы, прилегающие к поверхности М-клеток (1), обращенной в просвет кишечника, внутри пузырьков М-клеток (маленькая стрелка) и во внеклеточном пространстве (жирная стрелка) в непосредственной близости к вторгшейся клетке (2), возможно макрофагу. В соседней клетке (3) вирусов нет; $\times 14\,900$; [142].

происходит в лимфоидных фолликулах дыхательных путей и пищеварительного тракта [12]. Клеточные и вирусные генетические основы регуляции первичной инфекции неизвестны. Для таких вирусов, как грипп, вызывающих проявления болезни в месте проникновения, первичная репликация идет интенсивно и завершается развитием болезни.

Распространение вируса

Вирусы могут распространяться несколькими путями в зависимости от места проникновения и поражаемых ими органов-мишеней:

1. Нейронный путь (например, при бешенстве).
2. Лимфатический путь (много примеров).
3. Гематогенный: а) ассоциированный с клеточными элемен-

тами (например, при краснухе, или в случае цитомегаловируса); б) в свободном виде с плазмой (например, в случае энтеровирусов).

После инокуляции через кожу вирус бешенства проникает в периферические моторные нейроны, связываясь с ацетилхолиновыми рецепторами моторных концевых пластинок [83], и затем путем ретроградного распространения внутри аксона к клеткам передних рогов, спинальным ганглиям и головному мозгу [135]. Чаще вирусы распространяются к органам-мишеням с кровью или лимфой. При экспериментальном заражении вирусом полиомиелита культура клеток крови становится положительной на вирус до выявления вируса в нервной ткани [12]; вероятно, вирус находится в плазме в свободном, а не в связанном с клеточной фракцией состоянии [12]. Вирус краснухи распространяется в ассоциации с лимфоцитами крови [15, 54, 126], так же как цитомегаловирус [80] и вирус лимфоцитарного хориоменингита [27]. Реовирус и вирус полиомиелита распространяются из пейеровских бляшек к мезентериальным лимфоузлам, очевидно, через лимфу [12, 74], так как для распространения вируса требуется время и на ранних стадиях заражения он не появляется в более отдаленных органах, как можно было бы ожидать, если бы при этом происходила гематогенная инвазия.

Способность вирусов к распространению и интенсивность такого распространения, вероятно, определяются особыми генами вируса. Распространение введенного взрослым мышам через пищеварительный тракт реовируса определяется одним из наружных белков вирусного капсида — белком σ_1 (вирусным гемоглютинином) [74]. При таком введении серотип 1 (активно распространяющийся) и серотип 3 (ограниченно распространяющийся) различаются по способности распространяться к мезентериальным лимфоузлам и селезенке. Интенсивность распространения межтипных реассортантов, содержащих смеси генов реовирусов типа 1 и 3, коррелирует с родительским происхождением вирусного гена S1, кодирующего белок σ_1 . Кроме того, было обнаружено, что ограниченное распространение вируса типа 3 зависит от возраста хозяина. У 10-дневных мышей наблюдалось распространение от пейеровских бляшек только в лимфоузлы, но не в селезенку; у взрослых мышей вирус присутствовал в пейеровских бляшках временно и совсем не распространялся в лимфоузлы и селезенку [74].

При экспериментальном заражении мышей снижение по мере увеличения возраста животных способности вируса простого герпеса распространяться от места введения в центральную нервную систему коррелировало со снижением способности эксплантированных макрофагов мышей поддерживать репликацию вируса *in vitro* [66]. Эти исследования позволяют предположить,

что в интенсивности распространения вируса во время заражения играют роль как специфические продукты вирусных генов, так и физиологические факторы хозяина, например созревание макрофагов.

Сродство вирусов к клеткам и тканям и клеточные рецепторы

Специфическое сродство вирусов к клеткам и тканям чаще всего определяется присутствием на клеточной поверхности особых рецепторов для вируса. В некоторых случаях существование этих рецепторов показано, хотя их точная химическая природа еще не установлена. Для одного и того же вируса на клетках разных типов может существовать множество химически и структурно различающихся рецепторов [73, 98], а их содержание варьирует в зависимости от клеточного цикла [93] или других физиологических факторов. Холланд с соавторами [60, 90] впервые установил, что спектр хозяев зависит от ограничений, обусловленных возможностью связывания капсидных белков вируса с видоспецифическими рецепторами на поверхности клетки [90]. Мышечные клетки, в норме не чувствительные к вирусу полиомиелита млекопитающих, можно успешно заразить очищенной РНК этого вируса, что приводит к продукции вируса, имеющего тот же спектр хозяев, что и вирус, послуживший источником РНК [60]. Таким образом, блокирование репликации вируса полиомиелита в мышечных клетках происходит на поверхности, а не внутри клеток. Специфичность в отношении определенных клеток хозяев, связанная с присутствием на поверхности клеток специфических рецепторов, показана и для других вирусов, например для вируса Эпштейна—Барр в отношении В-лимфоцитов [67] и буньявирусов в отношении клеток головной части тела комаров [8, 9]. Известен по крайней мере один случай, когда в результате заражения клеток одним вирусом на их поверхности появляются рецепторы к другому вирусу, отсутствующие в норме [75]; при этом расширяется спектр хозяев второго вируса. Этот необычный механизм может объяснить расширение распространения инфекции для вирусов с относительно ограниченным спектром тканей хозяина, таких, например, как вирус Эпштейна—Барр [75].

Для реовирусов типа 1 и 3 выявлены специфические и резко различающиеся картины тропности и повреждений в мозгу новорожденных мышей. Реовирусы типа 3 вызывали разлитой летальный энцефалит (заражение нейронов), в то время как вирусы типа 1 вызывали эпендимит (заражение клеток эпендимы), завершающийся гидроцефалией, с незначительной смертностью. Генетические исследования с использованием межсеротип-

ных реассортантов выявили, что сродство вируса к нервным клеткам определяется единственным геном S1, кодирующим гемагглютинин [137]. В дальнейших исследованиях *in vitro* с использованием изолированных клеток эпендимы было показано, что эффективно и специфически связывается с поверхностью этих клеток только реовирус типа 1, но не реовирус типа 3 [129], что соответствует результатам, ожидаемым на основании картины клеточной тропности вируса *in vivo*. В связи с тем, что продукт гена S1 — вирусный гемагглютинин — является также белком, связывающимся с клеткой [82], вполне вероятно, что сродство вируса к специфическим клеткам нервной системы связано с присутствием на их поверхности серотипоспецифических рецепторов. Дальнейшие доказательства этой концепции были получены при изучении вариантов реовируса, отобранных по устойчивости к нейтрализации моноклональными антителами, специфичными по отношению к домену белка σ_1 , реагирующему с нейтрализующими антителами. Для таких вариантов наблюдали измененную картину патологии ЦНС: они заражали нейроны в ограниченном по сравнению с диким типом участке мозга [127], и их летальный потенциал был заметно ослаблен. В этих исследованиях было показано, что нейтрализуемый домен вирусного гемагглютинина является также участком, который связывается с рецепторами клеток (нейронов) в определенных зонах мозга. Описанные эксперименты значительно углубили наши знания о роли специфического взаимодействия вирус—клеточный рецептор в развитии болезни.

Штамм JHM вируса гепатита мышей в опытах *in vivo* обладает сродством к клеткам глиального происхождения в мозгу мышей, вызывая их демиелинизацию; при заражении этих клеток нейротропным вариантом вируса JHM *in vitro* выявляется сродство, наблюдаемое *in vivo*, т. е. специфически заражается центральная нервная система [87].

Второй, не зависящий от специфических рецепторов механизм органотропности выявляется при заражении определенными парамиксовирусами. В случае вируса Сендай для проявления инфекционности вируса необходимо протеолитическое расщепление вирусного гликопротеина оболочки — белка F (белка слияния) [116]; аналогичное свойство присуще вирусу гриппа, у которого протеолитическому расщеплению подвергается гемагглютинин [76, 81]. Если этими вирусами заражали клетки в культуре, не содержащие трипсиноподобного фермента, то наблюдали abortивный процесс с образованием неинфекционного вирусного потомства, неспособного осуществить многоцикловую инфекцию [81]. Выращенный в культуре ткани вирус Сендай с нерасщепленным белком F не реплицируется в легких мышей, зараженных воздушно-капельным путем, если его предваритель-

но не активировать путем расщепления трипсином [130]. Предварительная активация приводила к множественным циклам репликации и развитию пневмонии у мышей. Мутанты вируса с дефектом белка слияния, у которых этот белок можно расщепить только химотрипсином, но не трипсином, не способны вызывать у мышей пневмонию [130]. Даже при активации вируса химотрипсином *in vitro*, *in vivo* происходил только один цикл репликации, и полученное при этом вирусное потомство было неактивным из-за присутствия нерасщепленного белка F [130]. Следовательно, органотропность и развитие болезни в указанной системе могут быть связаны с содержанием активирующих ферментов, необходимых для многоциклового репликации вируса. К вирусной инфекции чувствительны только ткани, содержащие соответствующие протеолитические активирующие ферменты.

Повреждение клеток

Основным проявлением вирулентности вируса являются разрушение зараженных вирусом клеток в тканях-мишенях и возникающие в результате разрушения тканей физиологические изменения в организме хозяина. В некоторых случаях повреждению тканей способствует иммунный ответ хозяина (полнее этот вопрос будет рассмотрен ниже), однако, в основном оно обусловлено вирусной инфекцией и связанной с ней гибелью клеток. В то время как о биохимических сдвигах, происходящих в клетке при репликации вируса, известно достаточно много, специфические механизмы повреждающего воздействия вируса на клетку хозяина еще не выяснены. Большая часть вирусов, осуществляющих литический цикл репликации, изменяет метаболизм клетки хозяина, вызывая в ней уменьшение или прекращение синтеза ДНК, РНК и белка. Специфические механизмы, вызывающие эти изменения, за исключением случаев, рассмотренных ниже, в большинстве случаев неизвестны (см. гл. 11).

При заражении вирусом полиомиелита ингибируется транскрипция РНК клетки-хозяина и как следствие этого прекращается синтез хозяйских белков. В результате вирусной инфекции инактивируется клеточный белок (кэп-связывающий белок), ответственный за перенос 5'-концевой кэп-структуры m^7GpppN на мРНК клетки-хозяина [132]. Кэп-структура необходима для правильного взаимодействия рибосома — мРНК, в то время как в транскрипции вирусной мРНК ее участия не требуется. Инаktivация кэп-связывающего белка ведет к преимущественной транскрипции вирусной мРНК. Аналогично в клетках, зараженных вирусом гриппа, 5'-кэп-структуры и олигонуклеотиды, прилегающие к ним в ядерных предшественниках мРНК клетки-хозяина,

утилизируются в качестве затравок для репликации вирус-специфической РНК и синтеза мРНК; на РНК вируса гриппа они переносятся уникальным вирус-специфическим ферментом [109]. Так как экапированные молекулы мРНК в ядре утилизируются преимущественно до начала их трансляции, подавление синтеза белка клетки-хозяина может быть, по крайней мере частично, объясняется этим механизмом.

Реовирусная инфекция специфически разрушает цитоскелетную систему виментиновых промежуточных филаментов, но не изменяет микротрубочки или систему микрофиламентов [122]. Генетические исследования выявили, что ген S4 реовируса отвечает за прекращение синтеза РНК и белка клетки-хозяина [124], в то время как ген S1 определяет эффективность прекращения синтеза ДНК клетки-хозяина [123]. Механизм, ответственный за эти эффекты, еще неизвестен. Аналогичным образом в случае аденовируса ответственным за прекращение макромолекулярного синтеза клетки-хозяина является белок фибрилл [86]. Тельца внутриклеточных включений представляют собой участки с высокой концентрацией вирионов или вирусных макромолекул. В связи с тем что их можно видеть с помощью светового микроскопа, тельца включений полезны как гистологические индикаторы вирусной инфекции. Несомненно, что цитопатический эффект, наблюдаемый при вирусной инфекции, связан с индуцированным действием вируса на метаболизм клетки-хозяина, однако механизм, ответственный за специфические изменения, пока неизвестен. Даже если нет гистологически очевидного цитопатического эффекта, вирусная инфекция специфически изменяет характеристики обмена клетки-хозяина, включая угнетение синтеза некоторых специализированных клеточных продуктов («функции роскоши»). Это видно на примере уменьшения синтеза некоторых гормонов эндокринными клетками, зараженными вирусом лимфоцитарного хориоменингита [101]. Происходящие изменения могут оказывать глубокое влияние на организм.

Существуют и другие факторы вирулентности, правда, во многих случаях точный механизм, с помощью которого они воздействуют на вирусы, неизвестен. Гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа — это два гликопротеина вирусной оболочки, которые являются факторами вирулентности в том смысле, что они регулируют инфекционность вирионов потомства, выходящих из зараженных клеток в определенных тканях [81, 94, 128]. Нейраминидаза штамма WSN вируса гриппа действует в модельной системе мыши как фактор нейровирулентности; ферментативно удаляя остатки сиаловой кислоты с вирусного гемагглютинина, она делает его доступным для протеолитического расщепления, необходимого для проявления инфекционности вируса [94, 128]. Само расщепление гемагглютинина прямо определяет вирулент-

ность; вместе с тем нейраминидаза играет непрямую роль, делая гемагглютинин доступным для расщепления протеолитическими ферментами [94]. Аналогичным образом факторами вирулентности при экспериментальных заражениях мышей являются фрагменты мРНК буньявирусов, кодирующие гликопротеины оболочки [125].

У вируса бешенства фактором вирулентности для инфицирования центральной нервной системы после прямой внутрицеребральной инокуляции является поверхностный гликопротеин G. Варианты вируса, отобранные по устойчивости к нейтрализации некоторыми моноклональными антителами, имеют сниженную вирулентность при внутримозговом введении мышам [21, 22]. Анализ нуклеотидной последовательности клонированного гена G и вытекающий из него анализ аминокислотной последовательности кодируемого полипептида у двух независимо полученных аттенуированных вариантов показали, что аттенуация связана с заменой одной аминокислоты в специфическом участке полипептида [25]. Неизвестно чем обусловлен механизм аттенуации: нарушением связывания вируса с клетками или какими-либо другими аспектами репликации вируса. Однако указанные результаты свидетельствуют о высокой специфичности факторов, вовлеченных во взаимодействие вирус—клетка.

При внутримозговой инокуляции некоторые дикие изоляты реовирусов типа 3 обладают аттенуированной вирулентностью в ЦНС по сравнению с некоторыми лабораторными штаммами типа 3. Генетические исследования показали, что, хотя в этих вирусах присутствует ген S1 типа 3, определяющий сродство к нейронам, указанный эффект детерминирован геном M2 [64]. Репликация аттенуированного вируса в мозгу также была уменьшена по сравнению с вирулентными изолятами типа 3 и это позволяет предположить, что ген M2 играет роль в регуляции интенсивности репликации и таким путем изменяет вирулентность. Учитывая, что авирулентные изоляты легче инактивировались химотрипсином, чем вирулентные [64], можно предположить, что в регуляции нейровирулентности в этой системе играет роль чувствительность к протеолитическим ферментам.

При изучении экспериментального кератита, вызванного у кроликов вирусом простого герпеса, была обнаружена генетическая основа для развития либо эпителиального дендрита, либо более серьезной болезни стромы. Анализ болезни, вызванной рекомбинантами вируса, сконструированными путем скрещивания между штаммами, ответственными за определенную картину глазной болезни, показал, что эта картина детерминируется специфическими участками генома, расположенными в пределах одного фрагмента ДНК, выщепляемого рестрикционной эндонуклеазой [18]. Этот участок генома кодирует гликопротеины

вирусной оболочки, а также функции вируса, связанные с формированием синцития; однако дальнейший генетический анализ не подтвердил, что эти функции детерминируют картину глазной болезни [18]. Как показали эти исследования, методы рекомбинации ДНК позволяют проводить генетический анализ патогенеза вирусных болезней, вызываемых ДНК-содержащими вирусами, аналогичный тому, который был проведен для болезней, вызываемых РНК-содержащими вирусами.

Иммунный ответ и другие факторы защиты хозяина

При вирусной инфекции, кроме гуморального и клеточного специфического иммунного ответа, действует ряд других факторов защиты хозяина, контролирующих развитие, ограничение и подавление болезни (гл. 14). В генетических исследованиях с использованием рекомбинантных линий мышей, сконструированных из родительских линий СЗН и PR1, было обнаружено, что чувствительность или устойчивость к летальной инфекции вирусом гепатита мышей определяется одним доминантным аллелем [6]; у других линий другой аллель контролирует чувствительность к летальной инфекции вирусом Западно-Нильской лихорадки [47]. В случае гепатита мышей чувствительность хозяина к летальной инфекции отражается непосредственно в способности макрофагов, эксплантированных от резистентных или чувствительных животных, служить в качестве перmissive клеток для репликации вируса *in vitro* [6]. Многие вирусы, не вызывающие заболевания у старых животных, могут вызывать тяжелую болезнь у новорожденных. При периферическом введении вируса простого герпеса снижающаяся с возрастом животных патогенность вируса для центральной нервной системы коррелирует с увеличением устойчивости к вирусной инфекции макрофагов более старых животных *in vitro*. Аналогичным образом определяется возрастом хозяина вирулентность некоторых штаммов вируса кори для ЦНС у мышей [46]. Видимо, нейроны более старых животных менее чувствительны к вирусной инфекции. Таким образом, возраст хозяина существенно влияет на патогенность вирусов. Указанные исследования позволяют также предположить, что в некоторых случаях макрофаги играют важную роль в защите хозяина от вирусной инфекции, а также влияют на зависимые от возраста изменения в чувствительности к вирусным инфекциям.

Содержание сиаловой кислоты в гликопротеинах оболочки вируса Синдбис служит фактором вирулентности, регулирующим способность вирусов активировать альтернативный путь действия комплемента [57]. Снижение содержания сиаловой кислоты приводит к активации комплемента и более быстрому очищению

крови от вируса. Содержание сиаловой кислоты в вирусе определяется генетическими детерминантами хозяина, контролирующими содержание сиаловой кислоты во всех гликопротеинах клетки [58]; следовательно, эти детерминанты можно рассматривать как факторы вирулентности для вирусной инфекции. Активация комплемента может также играть роль в патогенезе аргентинской геморрагической лихорадки (вирус Хунин) [24] и шокового синдрома денге, развивающегося, вероятно, через активацию классического пути под действием иммунных комплексов.

Роль интерферона в защите хозяина от вирусных инфекций не вполне ясна. Интерферон может действовать непосредственно на зараженные вирусом клетки и угнетать продукцию вируса или же активировать противовирусную активность естественных киллерных клеток (natural killer, NK) [26, 55]. Индукция интерферона синтетическими веществами может предотвращать заражение верхних дыхательных путей риновирусами [106], но не все инфекции одинаково чувствительны к действию интерферона [44, 45].

Во время вирусной инфекции активируются как гуморальный, так и клеточный отделы иммунной системы. Однако для большинства вирусных инфекций нет пока единой точки зрения относительно специфической роли каждого из компонентов иммунной системы в защите и выздоровлении хозяина [13, 32, 56, 70, 78, 119, 140, 141, 145]. Недавно в проводимых в этой области исследованиях начали определять вирусные антигены, служащие участками распознавания для антител и иммунных клеток, исследовать клеточную основу развития и регуляции иммунного ответа, а также свойства клеток-эффекторов, участвующих в подавлении некоторых вирусных инфекций. Пока не удалось определить точную роль антител и иммунных клеток в подавлении вирусных инфекций, которая зависит от разнообразия вирусов, входных ворот инфекции, механизмов патогенеза и органов-мишеней. Тем не менее суммированные в настоящей главе данные отобраны таким образом, чтобы продемонстрировать известные для ряда вирусов механизмы.

У мышей развитие как гуморального, так и клеточного иммунитета зависит от взаимодействия вирусов со специфическим классом макрофагов, несущих на поверхности антиген гистосовместимости II типа — антиген Ia (соответствующий антигену DR человека) [32, 42, 84, 118], а также от образования определенных лимфокинов [118]. Экспрессия вирусных антигенов на поверхности клеток, зараженных как вирусами с оболочкой, так и вирусами без оболочки [76, 146], служит для инициации иммунного ответа и для формирования антигенов-мишеней, распознаваемых антителами и иммунными клетками [37, 72]. Определен-

ные вирусные белки распознаются иммунной системой и обуславливают специфичность иммунного ответа, а также регулируют активацию специфических функциональных частей иммунной системы. В случае реовирусов типоспецифические нейтрализующие антитела [138] и типоспецифические цитолитические Т-лимфоциты (ЦТЛ) [38], так же как и лимфоциты, осуществляющие реакцию гиперчувствительности замедленного типа [43, 139], направлены против белка σ_1 — вирусного гемагглютинина, продукта гена S1. Один и тот же домен этого полипептида, как определено с помощью моноклональных антител, распознается и нейтрализующими антителами, и ЦТЛ [37]. Другие структурные домены этого полипептида определяют способность вируса агглютинировать эритроциты человека [16]. Однако индукция Т-лимфоцитов-супрессоров реовирусом типа 3, инактивированным ультрафиолетом, которые были введены внутривенно [43] или перорально [115], связана с наличием гена M2, полученного инфицирующим вирусом от вируса типа 3. При этом супрессия серотипически специфична и эта специфичность наряду со специфичностью других иммунологических реакций, относящихся к реовирусам, определяется продуктом гена S1 — вирусным капсидным белком σ_1 [43, 115]. Общая концепция о том, что специфические вирусные белки распознаются иммунной системой и участвуют в таких функциях, как нейтрализация вируса и распознавание его иммунными Т-клетками, подтверждена для большого числа вирусов, включая вирусы гриппа [136], Синдбис [117], полиомиелита [31] и флавивirusы [13]. Такая специфичность, безусловно, имеет огромное значение в эпидемиологии и патогенезе вирусов, а также в разработке технологии получения вакцин.

Лизис клеток, зараженных вирусами, цитолитическими Т-лимфоцитами *in vitro* зависит от распознавания и взаимодействия Т-клеток со специфическими полипептидами вирусов и с антигенами гистосовместимости класса I (H-2 у мышей и HL-A у человека) на поверхности зараженных клеток [148]. Вирусные антигены экспрессируются на поверхности клеток на относительно ранних стадиях инфекции до продукции большей части вирионов; поэтому распознавание и лизис зараженных клеток ЦТЛ в это время могут лимитировать продукцию вирусного потомства, что было продемонстрировано *in vitro* для клеток, зараженных вирусом осповакцины [147]. Если это же наблюдается *in vivo*, то степень распространения вируса будет снижаться, а следовательно, и инфекция будет ограничиваться. При экспериментальной гриппозной пневмонии у мышей введение неиммунным реципиентам иммунных Т-лимфоцитов со специфическими маркерами цитолитических Т-лимфоцитов на клеточной поверхности защищает реципиентов от смертельной пневмонии [145] и

ускоряет выздоровление от выраженной пневмонии [140, 141]; сходный механизм существует для выздоровления от оспы мышей [10]. Естественные киллеры (NK) [55] и макрофаги [85] распознают и лизируют инфицированные вирусом клетки *in vitro* в отсутствие предварительной иммунизации и, таким образом, осуществляют первую линию защиты против вирусов еще до развития специфического иммунитета; после развития иммунитета они могут действовать в качестве клеток-эффекторов [10]. Макрофаги могут также лизировать клетки, зараженные вирусом *in vitro*, благодаря опосредованному антителами клеточному цитотоксическому действию, осуществляемому через Fc-рецепторы на поверхности макрофагов [77]. Точная роль NK-клеток и макрофагов в иммунитете *in vivo*, однако, еще полностью не выяснена [56, 78, 85].

Развитие гуморального иммунитета, лежащее в основе большинства программ иммунизации, очевидно, играет важную роль в защите хозяина от повторной инфекции тем же вирусом. Роль антител в выздоровлении при вирусной инфекции не очень ясна; известно лишь, что дети с врожденной агаммаглобулинемией могут страдать тяжелыми и длительными энтеровирусными инфекциями [142]. Те вирусы, которые в виде свободных частиц распространяются с током крови от места их проникновения к наиболее отдаленным участкам, лучше, чем другие, поддаются действию гуморальных факторов. При изучении пассивной иммунизации против вируса полиомиелита [11, 63] и активной иммунизации против вируса краснухи [104] обнаружили, что сама инфекция иммунизацией не блокируется, но клинические проявления болезни при этом не развиваются. В качестве иммуногенов вирусы диких типов более эффективны, чем вакцинные штаммы. Для формирования клеточного иммунитета против вирусов, очевидно, необходима репликация вирусов в той степени, в которой она происходит при использовании живых вирусных вакцин [111]; для развития гуморального иммунитета достаточно убитых вирусных вакцин.

Несмотря на то что иммунный ответ в целом полезен для хозяина и приводит организм к выздоровлению, в разных отделах иммунной системы отмечен и противоположный эффект, который может вносить вклад в патогенное действие вируса. Например, у частично иммунных индивидуумов противовирусные антитела могут способствовать увеличению патогенности вируса денге при шоковом синдроме [50]. При изучении *in vitro* показано опосредованное антителами увеличение репликации вируса денге в макрофагах [51, 52] в результате увеличения связывания комплексов вирус—антитело с рецепторами Fc на поверхности клеток [17, 107]; предполагают, что это один из механизмов, с помощью которых антитела осложняют вирусные заболе-

вания [107, 108]. Группа детей, иммунизированных экспериментально убитой вирусной вакциной, более тяжело переносила болезнь, вызванную естественным заражением респираторно-синцитиальным вирусом по сравнению с контрольной [19, 39, 69], однако точный механизм этого эффекта не установлен. У индивидуумов, иммунизированных убитой противокоревой вакциной, также было описано тяжелое течение болезни, вызванной естественным заражением вирусом кори (атипичная корь) [89]. Хроническая инфекция, развивающаяся при заражении новорожденных мышей вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCM), заканчивается продукцией циркулирующих иммунных комплексов (состоящих из вируса и противовирусного антитела), которые вызывают у зараженных животных иммунокомплексный гломерулонефрит [100]. Создание парабриза таких хронически инфицированных мышей с неинфицированными иммунными мышами либо перенос хронически инфицированным животным иммунной сыворотки или клеток селезенки от иммунных животных усиливает повреждение тканей больных животных, что позволяет предположить ведущую роль иммунной системы в патогенезе хронического заболевания, вызываемого LCM [100].

Иммунный ответ на вирусную инфекцию может также завершаться образованием аутоантител, направленных против нормальных тканей, не зараженных вирусом. У новорожденных мышей, зараженных реовирусом типа 1, развивается полиэндокринопатия с образованием антител, которые реагируют с антигенами в островках поджелудочной железы, передней доле гипофиза и слизистой желудка [103]. Использование реассортантного вируса показало, что за индукцию аутоантител ответствен ген S1 типа 1, кодирующий гемагглютинин вируса [103]. Подавление иммунитета антилимфоцитарной сывороткой предотвращает развитие полиэндокринного заболевания [102]. Иммунные реакции на инфекционные агенты, в том числе и на вирусы, могут сопровождаться образованием антиидиотипических антител, направленных против соединяющегося с антигеном участка (вариабильная часть) молекулы иммуноглобулина; не исключено, что этот процесс является частью регулирующей системы иммунитета, которая функционирует в ходе иммунного ответа [113, 79].

В некоторых случаях экспериментально полученные антиидиотипические антитела могут, подобно вирусам, связываться со специфическими вирусными рецепторами на клеточной поверхности [73, 98]. Таким образом, даже в тканях, непосредственно не зараженных вирусами, в результате действия иммунного ответа, направленного против вируса, могут происходить повреждения или изменения функции. Влияние расстроенной иммунной регуляции на антивирусный иммунный ответ и вирусный патогенез еще в полной мере не выяснено, но скорее всего,

если основываться на результатах, имеющихся к настоящему времени, оно должно быть значительным.

Персистенция вируса, латентность и медленные инфекции

В обычных условиях большинство вирусных инфекций относится к самоограничивающимся. Однако при некоторых обстоятельствах вирусы могут персистировать или становиться латентными в организме хозяина; при этом клинические проявления или реактивация вируса могут развиваться значительно позже момента заражения. *Персистентными* называют инфекции, при которых инфекционный вирус воспроизводимо и продолжительно выделяется из организма хозяина в течение значительно большего, чем при обычной инфекции, периода. Клинические проявления при персистентной инфекции могут быть выраженными, слабыми или полностью отсутствовать. При *латентных инфекциях* вирус остается в организме хозяина в скрытой форме; он выделяется при этом из организма с перерывами, обычно связанными с клиническими рецидивами болезни. *Медленные вирусные инфекции* характеризуются очень длительным инкубационным периодом, который измеряется месяцами и годами; в этот период клинические проявления отсутствуют. В некоторых случаях персистентная инфекция может быть связана с измененным ответом хозяина, т. е. с состоянием иммунодефицита или иммуносупрессии, или является результатом заражения в неонатальный период развития. Состояние персистенции или латентности может быть также естественным следствием заражения нормального хозяина некоторыми вирусами.

Персистентная инфекция ЦНС и мышц описана у детей с врожденной агаммаглобулинемией [23, 91, 142]. Пассивная иммунизация таких детей иммунной сывороткой вызывает улучшение клинического состояния [91]. Аналогичные случаи отмечены также у детей с дефицитом иммуноглобулинов, у которых в конечном итоге развивались смертельные инфекции дыхательных путей, вызванные вирусами парагриппа [65] и кори [30]. Ясно, что здесь за измененное течение болезни ответственны дефекты в системе защиты хозяина. Иногда у нормальных хозяев вирусы простого герпеса типа 1 и 2 вызывают латентную инфекцию сенсорных ганглиев ЦНС с периодической реактивацией вируса, часто но не всегда сопровождающейся клиническими проявлениями болезни. Инфекционный вирус простого герпеса был выделен из шейных и крестцовых ганглиев при аутопсии, путем совместного культивирования с восприимчивыми клетками [7, 134]. Новорожденный может заразиться во время родов от матери,

если у нее наблюдаются герпетические поражения шейки матки или она бессимптомно выделяет вирус простого герпеса типа 2. Таким образом, при персистентной или латентной инфекции организм может быть резервуаром для дальнейшего распространения вируса. Многие хронические инфекции, вызываемые вирусами, развиваются в результате иммуносупрессии. Вирус ветрянки/опоясывающего лишая, например, остается латентным в сенсорных ганглиях; рецидивы встречаются нечасто, обычно распространение идет по единичному периферическому нерву (опоясывающий лишай). ДНК вируса ветрянки/опоясывающего лишая была выявлена в сенсорных ганглиях через много лет после клинического проявления ветрянки [41].

Человеческий цитомегаловирус и вирус Эпштейна—Барр также являются представителями группы герпесвирусов, способными вызывать персистентную и латентную инфекцию и реактивироваться в результате иммуносупрессии. В мышиной модельной системе резервуаром цитомегаловирусов после острой инфекции служат В-лимфоциты [99] и макрофаги. Вирус может реактивироваться в результате поздней иммунологической реакции [99] или клеточной дифференцировки [29]. Персистентная инфекция вирусом Эпштейна—Барр у индивидуумов с иммуносупрессией может приводить к неопластической трансформации инфицированных лимфоцитов [53], а также к хроническому выделению вируса из дыхательных путей.

Мутанты HSV с дефектной тимидинкиназой, селекционированные по устойчивости к антивирусному препарату ациклоганозину [36], менее эффективно вызывают латентную инфекцию нейронов у экспериментальных животных [35, 36], что позволяет предположить участие гена тимидинкиназы в развитии латентной инфекции [131] или в более поздней реактивации вируса. Другие факторы, влияющие на способность вирусов вызывать латентную инфекцию, еще не идентифицированы; неизвестны также специфические механизмы, вызывающие реактивацию.

Чтобы выявить вирусные факторы, участвующие в развитии персистентной инфекции, были изучены многочисленные системы персистентно инфицированных культур клеток *in vitro*. Поскольку в этих системах отсутствует взаимодействие с иммунной системой хозяина, их связь с персистентной инфекцией является чисто умозрительной. Тем не менее эти культуры являются отличными уникальными моделями взаимодействия вирус—клетка, позволяющими в значительной мере изучить природу факторов, участвующих в инициации и поддержании персистирующего состояния. В большинстве изученных культур отмечены многочисленные генетические и биохимические изменения, относящиеся как к инфицирующим вирусам [4, 61], так и к клеткам хозяина [1, 112, 133]. В реовирусной системе обнаружены множествен-

ные генетические изменения в высокопассажной популяции дефектного интерферирующего вируса, используемой для инициации персистентной инфекции [3]. Популяция вируса, полученная из персистентно зараженных клеток через много месяцев после заражения, также содержит очень много мутантов [2, 5, 59, 97]. С помощью генетических методов идентифицированы специфические мутации, имеющие критическое значение как для инициации [3], так и для поддержания персистентной инфекции в культуре клеток [71]; другие изменения, по-видимому, не связаны с состоянием персистенции и заключаются в появлении не-селектируемых молчащих мутаций [2, 5, 59]. Кроме того, в процессе роста культуры-носителя эволюционируют также клетки хозяина [1, 112, 133]. В реовирусной системе селекции вирусных мутантов, более эффективно размножающихся в резистентных клетках, сопутствовало появление клеток, более устойчивых к заражению вирусом дикого типа [1]. Эти более устойчивые клетки изменялись также фенотипически: они были больше и содержали повышенное число лизосом [1]. Несмотря на то что точные биохимические механизмы, регулирующие персистенцию вирусов, еще неизвестны, изучение персистентно зараженных культур-носителей представляет уникальную модель совместной эволюции вирусов и клеток хозяина. Эти культуры представляют собой источник вирусных мутантов и мутантов клеток-хозяина.

Лучшими примерами «медленных» вирусных инфекций могут служить вирусные инфекции группы спонгиозных энцефалопатий, к которым относятся куру и болезнь Крейтцфельда—Якоба у человека [40] и скрейпи у овец. Вирус висны (неонкогенный ретровирус) вызывает хроническую, сходную с «медленной» инфекцию у овец. Прогрессирующие антигенные вариации вируса в ответ на иммунную реакцию хозяина во время персистентной инфекции, вероятно, увеличивают персистенцию вируса [96] при этой своеобразной инфекции. Агент, вызывающий скрейпи, имеет уникальную белковую структуру («прион») и не содержит определяемых количеств нуклеиновой кислоты [110]. Механизм его репликации и развития вызываемой им болезни неизвестен. Куру является хронической прогрессирующей болезнью нервной системы, встречающейся исключительно среди некоторых высокогорных племен Папуа Новой Гвинеи. Болезнь передается при ритуальном поедании мозга умерших предков; частота ее снизилась после того, как этот обычай был искоренен [40]. Инкубационный период измеряется годами, и после продолжительной болезни неизменно наступает смертельный исход. В зараженном мозгу отмечается незначительная воспалительная реакция [40]. Естественный способ передачи болезни Крейтцфельда—Якоба неизвестен. Не исключено, что она переносится при трансплантации рогаковицы от зараженных индивидуумов [28, 88] или при по-

едании мозга диких животных [68]. Исследования этой болезни технически трудны и поглощают много времени в связи с длительным инкубационным периодом и необычной природой инфекционных агентов.

Подострый склерозирующий панэнцефалит представляет собой позднее осложнение коревой инфекции, наступающее через несколько лет после перенесения острой болезни. После длительного бессимптомного периода развиваются прогрессирующие неврологические дисфункции, ведущие к смерти. Ультраструктурные исследования выявили в зараженных нейронах нуклеокапсидные структуры, подобные вирусу кори, тогда как инфекционный вирус встречается здесь редко [120]. В цереброспинальной жидкости больных найдены противокоревые антитела в высоких титрах [20], а из зараженного мозга был выделен кореподобный вирус путем его совместного культивирования с восприимчивыми клетками [62]. В сыворотках этих больных антитела к полипептиду М вируса кори имеют пониженный титр [20], что соответствует выраженному ослаблению синтеза полипептида М в зараженных нейронах [48, 49]. Механизм, ответственный за снижение синтеза полипептида М в клетках мозга, неизвестен, но отсутствие репродукции инфекционного вируса в нейронах может благоприятствовать персистенции вируса и развитию хронической болезни.

Прогрессирующая многофокусная лейкоэнцефалопатия является хронической демиелинизирующей болезнью ЦНС, вызываемой человеческим папавирусом, структурно и иммунологически сходным с обезьяньим вирусом SV40 [90, 105]. Ею обычно заболевают индивидуумы с ослабленным иммунитетом. Вместе с тем серологическая служба выявила, что антитела к этому вирусу широко распространены среди населения [121]. Из этого факта следует, что эндогенный латентный вирус может активироваться в период угнетения иммунитета и вызывать заболевание.

Представленные примеры иллюстрируют различия в механизмах развития персистентных, латентных, а также «медленных» вирусных инфекций, вызываемых сильно различающимися по механизму патогенеза вирусами. Однако в заключение следует отметить, что, так же как многие аспекты вирусного патогенеза, специфические механизмы, вызывающие персистенцию вирусов, нуждаются в подробных тщательных исследованиях.

Краткое содержание

В развитии болезни и в определении исхода взаимодействия вирус—хозяин участвуют многие независимые вирусные и хозяйские факторы. Недавние исследования, суммированные в этой

главе, показали, что на каждой стадии вирусной инфекции этот процесс можно себе представить на генетическом и биохимическом уровнях как серию четко разграничиваемых ступеней, подобно тому, как мы представляем себе процесс репликации самого вируса. Детальное изучение этих отдельных ступеней и соответствующих специфических механизмов должно способствовать успешному применению противовирусных стратегий с использованием вакцин и химиотерапевтических агентов. Это должно помочь также разработке стратегий, которые в настоящее время являются чисто умозрительными, например направленных на изменение реакции хозяина, в результате чего уменьшалось бы повреждение тканей и облегчался бы процесс избавления от вируса.

Литература

1. Ahmed R., Canning W. M., Kauffman R. S., Sharpe A. H., Hallum J. V., Fields B. N. (1981). Role of the host cell in persistent infection, *Cell*, **25**, 325—332.
2. Ahmed R., Chakraborty P. R., Graham A. F., Ramig R. F., Fields B. N. (1980). Genetic variation during persistent reovirus infection: Presence of extragenically suppressed temperature-sensitive lesions in wild-type virus isolated from persistently infected L cells, *J. Virol.*, **34**, 383—389.
3. Ahmed R., Field B. N. (1982). Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L cells, *Cell*, **28**, 605—612.
4. Ahmed R., Graham A. F. (1977). Persistent infections in L cells with temperature-sensitive mutants of reovirus, *J. Virol.*, **23**, 250—262.
5. Ahmed R., Kauffman R. S., Fields B. N. (1983). Genetic variation during persistent reovirus infection: Isolation of cold-sensitive and temperature-sensitive mutants from persistently infected L cells, *Virology*, **131**, 71—78.
6. Bang F. B., Warwick A. (1960). Mouse macrophage as host cells for the mouse hepatitis virus and the genetic basis of their susceptibility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 1065—1075.
7. Barringer J. R. (1974). Recovery of herpes simplex virus from human sacral ganglions, *N. Engl. J. Med.*, **291**, 828—830.
8. Beaty B. J., Bishop D. H. L. (1981). Molecular basis of Bunyavirus transmission by mosquitoes: Role of the middle-sized RNA segment, *Science*, **211**, 1433—1435.
9. Beaty B. J., Miller B. R., Shope R. E., Rozhon E. J., Bishop D. H. L. (1982). Molecular Basis of Bunyavirus per os infection of mosquitoes: Role of the middle sized RNA segment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1295—1297.
10. Blanden R. V. (1971). Mechanisms of recovery from a generalized viral infection: Mousepox. II. Passive transfer of recovery mechanisms with immune lymphoid cells, *J. Exp. Med.*, **133**, 1074—1089.
11. Bodian D. (1953). Experimental studies on passive immunization against poliomyelitis. III. Passive-active immunization and pathogenesis after virus feeding in chimpanzees, *Am. J. Hygiene*, **58**, 81—100.
12. Bodian D. (1955). Emerging concept of poliovirus infection, *Science*, **122**, 105—108.
13. Boere W. A. M., Benaissa-Trouw B. J., Harmsen M., Kraaijeveld C. A., Snippe H. (1983). Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies to the E₂ glycoprotein of Semliki Forest virus can protect mice from lethal encephalitis, *J. Gen. Virol.*, **64**, 1405—1408.
14. Bruatigam A. R., Dutko F. J., Olding L. B., Oldstone M. B. A. (1979). Pa-

- thogenesis of murine cytomegalovirus infection: The macrophage as a permissive cell for cytomegalovirus infection, replication and latency, *J. Gen. Virol.*, **44**, 349—359.
15. Buimovici-Klein E., Cooper L. Z. (1979). Immunosuppression and isolation of rubella virus from human lymphocytes after vaccination with two rubella vaccines, *Infect. Immunol.*, **25**, 352—356.
 16. Burstin S. J., Spriggs D. R., Fields B. N. (1982). Evidence for functional domains on the reovirus type 3 hemagglutinin, *Virology*, **117**, 146—155.
 17. Cardoso M. J., Porterfield J. S., Gordon S. (1983). Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages, *J. Exp. Med.*, **158**, 258—263.
 18. Centrifanto-Fitzgerald Y. M., Yamaguchi T., Kaufman H. E., Tognon M., Roizman B. (1982). Ocular disease pattern induced by herpes simplex virus is genetically determined by a specific region of viral DNA, *J. Exp. Med.*, **155**, 475—489.
 19. Chanock R. M., Kapikian A. Z., Mills J., Kim H. W., Parrott R. H. (1970). Influence immunological factors in respiratory syncytial virus disease of the lower respiratory tract, *Arch. Environ. Health.*, **21**, 347—355.
 20. Connolly J. H., Haire M., Hadden D. S. M. (1971). Measles immunoglobulins in subacute sclerosis panencephalitis, *Br. Med. J.*, **1**, 23—25.
 21. Coulon P., Rollin P., Aubert M., Flamand A. (1982). Molecular basis of rabies virus virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain with anti-G monoclonal antibodies, *J. Gen. Virol.*, **61**, 97—100.
 22. Coulon P., Rollin P. E., Flamand A. (1983). Molecular basis of rabies virus virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence, *J. Gen. Virol.*, **64**, 693—696.
 23. Davis L. E., Bodian D., Price D., Butler I. J., Vickers J. H. (1977). Chronic progressive poliomyelitis secondary to vaccination of an immunodeficient child, *N. Engl. J. Med.*, **297**, 241—245.
 24. deBracco M. M. E., Rimoldi M. T., Cossio P. M., Rabinovich A., Maiztegui J. I., Carballeda G., Arana R. N. (1978). Argentine hemorrhagic fever. Alterations of the complement system and anti-Junin-virus humoral response, *N. Engl. J. Med.*, **299**, 216—221.
 25. Dietzschold B., Wunner W. H., Wiktor T. J., Lopes A. D., Lafon M., Smith C. L., Koprowski H. (1983). Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabievirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 70—74.
 26. Djeu J. Y., Heinbaugh J. A., Holden H. T., Herberman R. B. (1979). Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon inducers, *J. Immunol.*, **122**, 175—181.
 27. Doyle M. V., Oldstone M. B. A. (1978). Interaction between viruses and lymphocytes. I. In vivo replication of lymphocytic choriomeningitis virus in mononuclear cells during both chronic and acute viral infections, *J. Immunol.*, **121**, 1262—1269.
 28. Duffy P., Wolf J., Collins G., Devoe A. G., Streeten B., Cowen D. (1974). Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease, *N. Engl. J. Med.*, **290**, 692—693.
 29. Dutko F. J., Oldstone M. B. A. (1981). Cytomegalovirus causes a latent infection in undifferentiated cells and is activated by induction of cell differentiation, *J. Exp. Med.*, **154**, 1636—1651.
 30. Enders J. F., McCarthy K., Milus A., Cheatham W. J. (1959). Isolation of measles virus at autopsy in cases of giant cell pneumonia without rash, *N. Engl. J. Med.*, **261**, 875—878.
 31. Evans D. M. A., Minor P. D., Schild G. S., Almond J. W. (1983). Critical role of an eight-amino acid sequence of VPI in neutralization of poliovirus type 3, *Nature (Lond.)*, **304**, 459—462.
 32. Fast L. D., Fan D. P. (1981). An adherent, radiosensitive accessory cell ne-

- cessary for mouse cytolytic T lymphocyte response to viral antigen, *J. Immunol.*, **126**, 1114—1119.
33. *Fenner F.* (1948). The pathogenesis of the acute exanthems, *Lancet*, **2**, 915—920.
 34. *Field H. J., Anderson J. R., Wildy P.* (1982). Atypical patterns of neural infection produced in mice by drugresistant strains of herpes simplex virus, *J. Gen. Virol.*, **59**, 91—99.
 35. *Field H. J., Darby G.* (1980). Pathogenicity in mice of strains of herpes simplex virus which are resistant to acyclovir in vitro and in vivo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 209—216.
 36. *Field H. J., Darby G., Wildy P.* (1980). Isolation and characterization of acyclovir resistant mutants of herpes simplex virus, *J. Gen. Virol.*, **49**, 115—124.
 37. *Finberg R., Spriggs D. R., Fields B. N.* (1982). Host immune response to reovirus: CTL recognize the major neutralization domain of the viral hemagglutinin. *J. Immunol.*, **129**, 2235—2238.
 38. *Finberg R., Weiner H. L., Fields B. N., Benacerraf B., Burakoff S. J.* (1979). Generation of cytolytic T lymphocytes after reovirus infection: Role of SI gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 442—446.
 39. *Fulginiti V. A., Eller J. J., Sieber O. F., Joyner J. W., Minamitani M., Meiklejohn G.* (1969). Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines: an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum precipitated respiratory syncytial virus vaccine, *Am. Hygiene*, **89**, 435—446.
 40. *Gajdusek D. C.* (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru, *Science*, **197**, 943—960.
 41. *Gilden D. H., Vafai A., Shtram Y., Becker Y., Devlin M., Wellish M.* (1983). Varicella-zoster virus DNA in human sensory ganglia, *Nature (Lond.)*, **306**, 478—480.
 42. *Gomard E., Wybier-Frangui J., Levy J. P.* (1981). Accessory cells in the in vitro generation of type C virus specific T killer lymphocytes. I. Role of macrophages in primary anti-FMR reaction, *J. Immunol.*, **126**, 891—896.
 43. *Greene M. I., Weiner H. L.* (1980). Delayed hypersensitivity in mice infected with reovirus. II. Induction of tolerance and suppressor T cells to viral specific gene products, *J. Immunol.*, **125**, 283—287.
 44. *Gresser I., Tovey M. G., Bandu M. T., Maury G., Bronty-Boye D.* (1976). Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. I. Rapid evolution of encephalomyocarditis virus infection, *J. Exp. Med.*, **144**, 1305—1315.
 45. *Gresser I., Tovey M. G., Bandu M. T., Maury G., Bronty-Boye D.* (1976). Role of interferon in the pathogenesis of virus disease in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. II. Studies with herpes simplex virus, Moloney, sarcoma virus, Newcastle disease virus and influenza virus, *J. Exp. Med.*, **144**, 1316—1323.
 46. *Griffin D. E., Mullinix J., Narayan O., Johnson R. T.* (1974). Age dependence of viral expression: Comparative pathogenesis of two rodent-adapted strains of measles virus in mice, *Infect. Immunol.*, **9**, 690—695.
 47. *Groschel D., Koprowski H.* (1965). Development of a virusresistant inbred mouse strain for the study of innate resistance to Arbo B viruses, *Arch. Ges. Virusforsch.*, **17**, 379—391.
 48. *Hall W. H., Choppin P. W.* (1979). Evidence for lack of synthesis of M polypeptide of measles virus in brain cells in subacute sclerosing panencephalitis, *Virology*, **99**, 443—447.
 49. *Hall W. H., Choppin P. W.* (1981). Measles virusproteins in the brain tissue of patients with subacute sclerosing panencephalitis. Absence of the M protein, *N. Engl. Med.*, **304**, 1152—1155.
 50. *Halstead S. B., Nimmannitaya S., Cohen S. N.* (1970). Observations related

- to pathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered, *Yale J. Biol. Med.*, **42**, 311—328.
51. *Halstead S. B., O'Rourke E. J.* (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody, *J. Exp. Med.*, **146**, 201—217.
 52. *Halstead S. B., O'Rourke E. J., Allison A. C.* (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection, *J. Exp. Med.*, **146**, 218—229.
 53. *Hanto D. W., Frizzera G., Gajl-Peczalska K. J., Sakamoto K., Purtilo D. T., Balfour H. H., Jr., Simmons R. L., Najarian J. S.* (1982). Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **306**, 913—918.
 54. *Heggie A. D., Robbins F. C.* (1964). Rubella in naval recruits. A virologic study, *N. Engl. J. Med.*, **271**, 231—234.
 55. *Herberman R. B., Ortaldo J. R.* (1981). Natural killer cells: Their role in defenses against disease, *Science*, **214**, 24—30.
 56. *Hirsch R. L.* (1981). Natural killer cells appear to play no role in recovery of mice from Sindbis virus infection, *Immunology*, **43**, 81—89.
 57. *Hirsch R. L., Griffin D. E., Winkelstein J. A.* (1981). Host modification of Sindbis virus sialic acid content influences alternative complement pathway activation and virus clearance, *J. Immunol.*, **127**, 1740—1743.
 58. *Hirsch R. L., Griffin D. E., Winkelstein J. A.* (1983). Natural immunity to Sindbis virus is influenced by host tissue sialic acid content, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 548—550.
 59. *Holland J. J., Grabau E. A., Jones C. L., Semler B. L.* (1979). Evolution of multiple genome mutations during long term persistent infection by visicular stomatitis virus, *Cell*, **16**, 495—504.
 60. *Holland J. J., McLaren L. C., Syverton J. T.* (1959). The mammalian cell-virus relationship. IV. Infection of naturally unsusceptible cells with enterovirus nucleic acid, *J. Exp. Med.*, **110**, 65—80.
 61. *Holland J. J., Villarreal L. P.* (1974). Persistent noncytotoxic vesicular stomatitis virus infections mediated by defective T particles that suppress virion transcriptase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2956—2960.
 62. *Horta-Barbosa L., Fuccillo D. A., London W. T., Jabbour J. T., Zeman W., Sever J. L.* (1969). Isolation of measles virus from brain cell cultures of two patients with subacute sclerosis panencephalitis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 272—277.
 63. *Howe H. A., Bodian D., Morgan I. M.* (1950). Subclinical polymyelitis in the chimpanzee and its relation to alimentary re-infection, *Am. J. Hygiene*, **51**, 85—108.
 64. *Hrdy D. B., Rubin D. H., Fields B. N.* (1982). Molecular basis of reovirus neurovirulence: Role of the M2 gene in avirulence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1298—1302.
 65. *Jarvis W. R., Middleton P. J., Gelfand E. W.* (1979). Parainfluenza pneumonia in severe combined immunodeficiency disease, *J. Pediatr.*, **94**, 423—426.
 66. *Johnson R. T.* (1964). The pathogenesis of herpes virus encephalitis. II. A cellular basis for the development of resistance with age, *J. Exp. Med.*, **120**, 359—374.
 67. *Jondal M., Klein G.* (1973). Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **138**, 1365—1378.
 68. *Kamin M., Patten B. M.* (1984). Greutzfeld-Jakob disease: Possible transmission to humans by consumption of wild animal brains, *Am. J. Med.*, **76**, 142—145.
 69. *Kapikian A. Z., Mitchell R. H., Chanock R. M., Shvedoff R. A., Stewart C. E.* (1969). An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory

- syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine, *Am. J. Epidemiol.*, **89**, 405—421.
70. Kapoor A. K., Nash A. A., Wildy P. (1982). Pathogenesis of herpes simplex virus in B cell-suppressed mice: The relative role of cell-mediated and humoral immunity, *J. Gen. Virol.*, **61**, 127—131.
 71. Kauffman R. S., Ahmed R., Fields B. N. (1983). Selection of a mutant SI gene during reovirus persistent infection of L cells: Role in maintenance of the persistent state, *Virology*, **131**, 79—87.
 72. Kauffman R. S., Lee S., Finberg R. (1983). Cytolytic T-cell mediated lysis of reovirus-infected cells: Requirements for infectious virus, viral particles and viral proteins in infected target cells, *Virology*, **131**, 265—273.
 73. Kauffman R. S., Noseworthy J. H., Nepom J. T., Finberg R., Fields B. N., Greene M. I. (1983). Cell receptors for the mammalian reovirus. II. Monoclonal anti-idiotypic antibody blocks viral binding to cells, *J. Immunol.*, **131**, 2539—2541.
 74. Kauffman R. S., Wolf J. L., Finberg R., Trier J. S., Fields B. N. (1983). The σ_1 protein determines the extent of spread of reovirus from the gastrointestinal tract of mice, *Virology*, **124**, 403—410.
 75. Khelifa R., Menezes J. (1983). Sendai virus envelopes can mediate Epstein-Barr virus binding to and penetration into Epstein-Barr virus receptor-negative cells, *J. Virol.*, **46**, 325—332.
 76. Klenk H. D., Rott R., Orlich M., Blodorn J. (1975). Activation of influenza virus by trypsin treatment, *Virology*, **68**, 426—439.
 77. Kohl S. D., Cahall D. L., Walters D. L., Schaffner V. E. (1979). Murine antibody-dependent cellular cytotoxicity to herpes simplex virus-infected target cells, *J. Immunol.*, **123**, 25—30.
 78. Kohl S., Loo L. S., Pickering L. K. (1981). Protection of neonatal mice against herpes simplex viral infection by human antibody and leukocytes from adult, but not neonatal humans, *J. Immunol.*, **127**, 1273—1275.
 79. Kuettner M. G., Wang A. L., Nisonoff A. (1972). Quantitative investigations of idiotype antibodies. VI. Idiotype specificity as a potential genetic marker for the variable regions of mouse immunoglobulin polypeptide chains, *J. Exp. Med.*, **135**, 579—595.
 80. Lang D. J., Noren B. (1968). Cytomegaloviremia following congenital infection, *J. Pediatr.*, **73**, 812—819.
 81. Lazarowitz S. G., Choppin P. W. (1975). Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide, *Virology*, **68**, 440—454.
 82. Lee P. W. K., Hayes E. C., Joklik W. K. (1981). Protein σ_1 is the reovirus cell attachment protein, *Virology*, **108**, 156—163.
 83. Lentz T. L., Burrage T. G., Smith A. L., Crick J., Tignor G. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*, **215**, 182—184.
 84. Letvin N. L., Kauffman R. S., Finberg R. (1981). T lymphocyte immunity to reovirus: Cellular requirements for generation and role in clearance of primary infections, *J. Immunol.*, **127**, 2334—2339.
 85. Letvin N. L., Kauffman R. S., Finberg R. (1982). An adherent cell lyses virus-infected targets: Characterization, activation, and fine specificity of the cytotoxic cell, *J. Immunol.*, **129**, 2396—2401.
 86. Levine A. J., Ginsberg H. S. (1967). Mechanism by which fiber antigen inhibits multiplication of type 5 adenovirus, *J. Virol.*, **4**, 747—757.
 87. Lucas A., Flintoff W., Anderson R., Percy D., Coulter M., Dales S. (1977). In vivo and in vitro models of demyelinating diseases: Tropism of the JHM strain of murine hepatitis virus for cells of glial origin, *Cell*, **12**, 553—560.
 88. Manuelides E. E., Angelo J. N., Gorgacz E. J., Kim J. H., Manuelides L. (1977). Experimental Creutzfeldt-Jakob disease transmitted via the eye with infected cornea, *N. Engl. J. Med.*, **296**, 1334—1336.

89. Martin D. B., Weiner L. B., Nieburg P. I., Blair D. C. (1979). Atypical measles in adolescents and young adults, *Ann. Intern. Med.*, **90**, 877—881.
90. McClaren L. C., Holland J. J., Syverton J. T. (1959). The mammalian cell-virus relationship. I. Attachment of poliovirus to cultivated cells of primate and non-primate origin, *J. Exp. Med.*, **109**, 475—485.
91. Mease P. J., Ochs H. D., Wedgwood R. J. (1981). Successful treatment of echovirus meningoencephalitis and myositis-fasciitis with intravenous immune globulin therapy in a patient with X-linked agammaglobulinemia, *N. Engl. J. Med.*, **304**, 1278—1281.
92. Mims C. A. (1964). Aspects of pathogenesis of virus diseases, *Bacteriol. Rev.*, **28**, 30—71.
93. Morishima T., McClintock P. R., Billups L. C., Notkins A. L. (1982). Expression and modulation of virus receptors on lymphoid and myeloid cells: Relationship to infectivity, *Virology*, **116**, 605—618.
94. Nakajima S., Sigiura A. (1980). Neurovirulence of influenza virus in mice. II. Mechanism of virulence as studied in a neuroblastoma cell line, *Virology*, **101**, 450—457.
95. Narayan O., Penny J. B., Johnson R. T., Herndon R. M., Weiner L. P. (1973). Etiology of progressive multifocal leukoencephalopathy: Identification of papovavirus, *N. Engl. J. Med.*, **289**, 1278—1282.
96. Narayan O., Clements J. E., Griffin D. E., Wolinsky J. S. (1981). Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of Visna virus, *Infect. Immunol.*, **32**, 1045—1050.
97. Nishiyama Y., Ito Y., Shimokata K. (1978). Properties of the viruses selected during persistent infection of L cell swith VSV, *J. Gen. Virol.*, **40**, 481—484.
98. Noseworthy J. H., Fields B. N., Dichter M. A., Sobotka C., Pizer E., Perry L. L., Nepom J. T., Greene M. I. (1983). Cell receptors for the mammalian reovirus. I. Syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody identifies a cell surface receptor for reovirus. — *J. Immunol.*, **131**, 2533—2538.
99. Olding L. B., Jensen F. C., Oldstone M. B. A. (1975). Pathogenesis of cytomegalovirus infection. I. Activation of virus from bone marrow derived lymphocytes by in vitro allogeneic reaction, *J. Exp. Med.*, **141**, 561—572.
100. Oldstone M. B. A., Dixon F. J. (1970). Pathogenesis of chronic disease associated with persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. II. Relationship of the anti-lymphocytic choriomeningitis immune response to tissue injury in chronic lymphocytic choriomeningitis disease, *J. Exp. Med.*, **131**, 1—17.
101. Oldstone M. B. A., Sinha Y. N., Blount P., Tishon A., Rodriguez M., Von Wedel R., Lampert P. W. (1982). Virus-induced alterations in homeostasis: Alterations in differentiated functions of infected cells in vivo, *Science*, **218**, 1125—1127.
102. Onodera T., Ray U. R., Melez K. A., Suzuki H., Toniolo A., Notkins A. L. (1982). Virus-induced diabetes mellitus: Autoimmunity and polyendocrine disease prevented by immunosuppression, *Nature (Lond.)*, **297**, 66—68.
103. Onodera T., Toniolo A., Ray U. R., Jensen A. B., Knazek R. A., Notkins A. L. (1981). Virus-induced diabetes mellitus. XX. Polyendocrinopathy and autoimmunity, *J. Exp. Med.*, **153**, 1457—1473.
104. O'Shea S., Best J. M., Banatvala J. E. (1983). Viremia, virus excretion, and antibody responses after challenge in volunteers with low levels of antibody to rubella virus, *J. Inf. Dis.*, **148**, 639—647.
105. Padgett B. L., Zurhein G. M., Walker D. L., Eckroade R. J., Dessel B. H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy, *Lancet*, **1**, 1257—1260.
106. Panusarn E., Stanley E. D., Dirda V., Rubenis M., Jackson G. G. (1974). Prevention of illness from rhinovirus infection by a topical interferon inducer, *N. Engl. J. Med.*, **291**, 57—61.

107. *Peiris J. S. M., Gordon S., Unkeless J. C., Porterfield J. S.* (1981). Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages, *Nature (Lond.)*, **289**, 189—191.
108. *Peiris J. S. M., Porterfield J. S.* (1979). Antibody-mediated enhancement of flavivirus replication in macrophage-like cell lines, *Nature (Lond.)*, **282**, 509—511.
109. *Plotch S. J., Bouloy M., Krug R. M.* (1979). Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1618—1622.
110. *Prusiner S. B.* (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science*, **216**, 136—144.
111. *Reiss C. S., Schulman J. L.* (1980). Cellular immune responses of mice to influenza virus vaccines, *J. Immunol.*, **125**, 2182—2188.
112. *Reznikoff C., Tegtmeyer P., Dohan C. Jr., Enders J. F.* (1972). Isolation of AGMK cells partially resistant to SV40: Identification of the resistant step, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **141**, 740—746.
113. *Rose L. M., Goldman M., Lambert P. H.* (1982). Simultaneous induction of an idiotypic, corresponding anti-idiotypic antibodies, and immune complexes during African trypanosomiasis in mice, *J. Immunol.*, **128**, 79—85.
114. *Rubin D. H., Fields B. N.* (1980). The molecular basis of reovirus virulence: The role of the M2 gene, *J. Exp. Med.*, **152**, 853—868.
115. *Rubin D. H., Weiner H. L., Fields B. N., Greene M. I.* (1981). Immunologic tolerance after oral administration of reovirus: Requirement for two viral gene products for tolerance induction, *J. Immunol.*, **127**, 1697—1701.
116. *Schied A., Choppin P. W.* (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus, *Virology*, **57**, 475—490.
117. *Schmaljohn A. L., Johnson E. D., Dalrymple J. M., Cole G. A.* (1982). Non-neutralizing monoclonal antibodies can prevent lethal alphavirus encephalitis, *Nature (Lond.)*, **297**, 70—72.
118. *Schmid D. S., Larsen H. S., Rouse B. T.* (1982). Role of Ia antigen and secretory function of accessory cells in the induction of cytotoxic T lymphocyte responses against herpes simplex virus, *Infect. Immunol.*, **37**, 1138—1147.
119. *Sethi K. K., Omata Y., Schneeweis K. E.* (1983). Protection of mice from fatal herpes simplex virus type I infection by adoptive transfer of cloned virus-specific and H2-restricted cytotoxic T lymphocytes, *J. Gen. Virol.*, **64**, 443—447.
120. *Sever J. L., Zeman W., eds.* (1968). Conference on Measles Virus and Subacute Sclerosis Panencephalitis, Bethesda, Md., Sept. 13, 1967, Part 2, *Neurology*, **19**(1), 30—51.
121. *Shah K. V., Daniel R. W., Warszawski R. M.* (1973). High prevalence of antibodies to BK virus, an SV-40 related papovirus, in residents of Maryland, *J. Inf. Dis.*, **128**, 784—787.
122. *Sharpe A. H., Chen L. B., Fields B. N.* (1982). The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells, *Virology*, **120**, 399—411.
123. *Sharpe A. H., Fields B. N.* (1981). Reovirus inhibition of cellular DNA synthesis: Role of the S1 gene, *J. Virol.*, **38**, 389—392.
124. *Sharpe A. H., Fields B. N.* (1982). Reovirus inhibition of cellular RNA and protein synthesis: Role of the S4 gene, *Virology*, **122**, 381—391.
- 124a. *Sharpe A. H., Fields B. N.* (1983). Pathogenesis of reovirus infection. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 229—286, Plenum Press, New York.
125. *Shope R. E., Rozhon E. J., Bishop D. H. L.* (1981). Role of the midsized bunyavirus RNA segment in mouse virulence, *Virology*, **114**, 273—276.

126. *Simons M. J., Jack I.* (1968). Lymphocyte viremia in congenital rubella, *Lancet*, **2**, 953—954.
127. *Spriggs D. R., Bronson R. T., Fields B. N.* (1983). Hemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropism, *Science*, **220**, 505—507.
128. *Sugiura A., Ueda M.* (1980). Neurovirulence of influenza virus in mice. I. Neurovirulence of recombinants between virulent and avirulent virus strains, *Virology*, **101**, 440—449.
129. *Tardieu M., Weiner H. L.* (1982). Viral receptors on isolated murine and human ependymal cells, *Science*, **215**, 419—421.
130. *Tashiro M., Homma M.* (1983). Pneumotropism of Sendai virus in relation to protease-mediated activation in mouse lungs, *Infect. Immunol.*, **39**, 879—888.
131. *Tenser R. B., Dunstan M. E.* (1979). Herpes simplex virus thymidine kinase expression in infection of the trigeminal ganglion, *Virology*, **49**, 417—422.
132. *Trachsel H., Sonenberg N., Shalhin A. J., Rose J. K., Keong K., Bergmann J. E., Gordon J., Baltimore D.* (1980). Purification of a factor that restores translation of vesicular stomatitis virus mRNA in extracts from poliovirus infected HeLa cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 770—774.
133. *Vogt M., Dulbecco R.* (1958). Properties of HeLa cell culture with increased resistance to poliomyelitis virus, *Virology*, **5**, 425—434.
134. *Warren K. G., Brown S. M., Wrublewska Z., Gilden D., Koprowski H., Subak-Sharpe J.* (1978). Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human beings, *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1068—1069.
135. *Watson H. D., Tignor G. H., Smith A. L.* (1981). Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice, *J. Gen. Virol.*, **56**, 371—382.
136. *Webster R. G., Laver W. G., Air G. M., Schild G. C.* (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses, *Nature (Lond.)*, **296**, 115—121.
137. *Weiner H. L., Drayna D., Averill D. R., Jr., Fields B. N.* (1977). Molecular basis of reovirus virulence: Role of the SI gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5744—5748.
138. *Weiner H. L., Fields B. N.* (1977). Neutralization of reovirus: The gene responsible for the neutralization antigen, *J. Exp. Med.*, **146**, 1305—1310.
139. *Weiner H. L., Greene M. I., Fields B. N.* (1980). Delayed hypersensitivity in mice infected with reovirus. I. Identification of host and viral gene products responsible for the immune response, *J. Immunol.*, **125**, 278—282.
140. *Wells M. A., Albrecht P., Ennis F. A.* (1981). Recovery from a viral respiratory infection. I. Influenza pneumonia in normal and T-deficient mice, *J. Immunol.*, **126**, 1036—1041.
141. *Wells M. A., Ennis F. A., Albrecht P.* (1981). Recovery from a viral respiratory infection. II. Passive transfer of immune spleen cells to mice with influenza pneumonia, *J. Immunol.*, **126**, 1042—1046.
142. *Wilfert C. M., Buckley R. H., Mohanakumar T., Griffith J. F., Katz S. L., Whisnant J. K., Eggleston P. A., Moore M., Treadwell E., Oxman M. N., Rosen F. S.* (1977). Persistent and fatal central-nervous-system echovirus infections in patients with agammaglobulinemia, *N. Engl. J. Med.*, **296**, 1485—1489.
- 142a. *Wolf J. L., Kauffman R. S., Fingers R., Dambrauskas R., Fields B. N., Trier J. S.* (1983). Determinants of reovirus interaction with the intestinal M cells and absorptive cells of murine intestine, *Gastroenterology*, **85**, 291—300.
143. *Wolf J. L., Bye W. A.* (1984). The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system, *Ann. Rev. Med.*, **35**, 95—112.
144. *Wolf J., Rubin D. H., Finberg R., Kauffman R. S., Sharpe A. H., Trier J. S., Fields B. N.* (1981). Intestinal M cells: A pathway for entry of reovirus into the host, *Science*, **212**, 471—472.

145. *Yap K. L., Ada G. L., McKenzie I. F. C.* (1978). Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus, *Nature* (Lond.), **273**, 238—239.
146. *Zarling D. A., Miskimen J. A., Fan D. P., Fujimoto E. K., Smith P. K.* (1982). Association of Sendai virion envelope and a mouse surface membrane polypeptide on newly infected cells: Lack of association with H-2K/D or alteration of viral immunogenicity, *J. Immunol.*, **128**, 251—257.
147. *Zinkernagel R. M., Althage A.* (1977). Antiviral protection by virus-immune cytotoxic T cells: Infected target cells are lysed before infectious progeny virus is assembled, *J. Exp. Med.*, **145**, 644—651.
148. *Zinkernagel R. M., Doherty P. C.* (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biologic role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness, *Adv. Immunol.*, **27**, 51—177.

Метаболизм вирусов и клеточная архитектура

Шелдон Пенмен¹

Цитоплазматический и ядерный скелет

По-видимому, самые фундаментальные вопросы клеточной биологии — это вопросы клеточной и тканевой архитектуры и такие связанные с ними явления, как подвижность клетки и митоз. Многие принципы, лежащие в основе сборки, функционирования и природы клеточных структур, начинают проясняться только сейчас. Относительно низкий уровень наших знаний в этой области можно объяснить, в частности, ограниченными возможностями тех методов исследования морфологических особенностей, которыми мы располагаем. Световой микроскоп позволяет выявить высокоупорядоченные субклеточные скелетные структуры, но обладает слишком малым разрешением. Что же касается стандартного метода тонких срезов в электронной микроскопии, то результаты, полученные с его помощью, весьма скудны, если не считать исследований клеточных структур, связанных с мембраной. Цитоскелет на обычном залитом срезе виден плохо, хотя из опытов с использованием флуоресцентных антител известно, что он существует. Ядра на стандартных срезах просматриваются лишь как скопления волокон хроматина, и, чтобы обнаружить более тонкую их организацию, приходится применять чрезвычайно сложные, специальные методики [36, 39].

Можно изучать биохимию структурных элементов с помощью фракционирования клеток, однако прогресс в этой области сдерживается отсутствием хороших морфологических маркеров. Главный недостаток электронной микроскопии состоит в том, что смолы, используемые при приготовлении тонких срезов, в значительной степени маскируют белковые структуры. Недавно попытались вновь использовать ранние методы электронной микроскопии без заливки [26, 38a]; в результате удалось с поразительной четкостью визуализировать трехмерную структуру кле-

¹ *Sheldon Penman*, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139.

точного белкового скелета, причем многие детали клеточной архитектуры были выявлены впервые. С помощью электронного микроскопа удастся увидеть фиксированные и обработанные методом высушивания в критической точке интактные клетки [52]. Портер и др. показали, что сложная белковая сеть, которая видна в электронном микроскопе, состоит из обычных клеточных белков, в том числе и растворимых. Однако в полной мере возможности электронной микроскопии без заливки реализуются лишь при использовании избирательной экстракции, в результате которой удаляются растворимые белки [9, 32, 38, 45, 46, 48]. Оставшиеся скелетные структуры можно разделить на цитоскелет, хроматин и компоненты ядерного матрикса [15, 22, 37]. Далее можно исследовать морфологию и биохимию этих структур. На первый взгляд кажется удивительным, что электронная микроскопия объектов, помещенных в вакуум, обладает гораздо более высоким разрешением, чем электронная микроскопия объектов, залитых в смолы. Однако это объясняется чрезвычайной сложностью и переплетенностью клеточного скелета. Клеточный скелет — это свободно стоящая, самоподдерживающаяся структура. Такая структура должна быть видна в вакууме, если она по крайней мере на несколько нанометров возвышается над подложкой. Наиболее важные вирус-специфические белки и нуклеиновые кислоты часто можно обнаружить лишь в одной фракции, в комплексе с каким-либо структурным компонентом клетки; например, РНК полиовируса связана с цитоскелетом, а вирион SV40 — с ядерным матриксом [3, 31].

Результаты применения этих новых процедур в вирусологических исследованиях весьма впечатляющи. С их помощью были обнаружены многие клеточные структуры, причем оказалось, что по крайней мере отчасти метаболизм всех вирусов животных предполагает использование структур цитоплазматического и ядерного скелета клеток. Действительно, вирус-специфический цитопатический эффект легко объяснить, предположив, что он обусловлен не бессмысленным для вируса повреждением клетки, а специфической перестройкой элементов клеточного скелета, цель которой — создание условий для роста вируса. Сейчас с помощью электронной микроскопии без заливки и биохимического фракционирования можно прямо изучать связь между метаболизмом вирусов и клеточной архитектурой.

До недавнего времени большое внимание в вирусологии уделялось изучению способов экспрессии уникальных информационных вирусных систем, т. е. «молекулярной биологии» животных и растительных вирусов; топографические же аспекты поведения вирусов оставались в стороне. Такие вопросы, как транспорт вирусных продуктов из одного клеточного компартмента в другой, сборка вируса и его созревание в определенных областях клетки,

а также удивительные специфические перестройки архитектуры клетки, относящиеся к понятию «цитопатический эффект», остаются пока малоизученными. Эти пробелы в наших знаниях объясняются не отсутствием интереса к данным вопросам, а недостатком концепций и экспериментальных подходов к решению таких проблем.

При приготовлении клеточных препаратов для электронной микроскопии (ЭМ) без заливки используются две методики. Самая простая из них — нанесение целого объекта, при которой клетки выращивают на золотой электронно-микроскопической сетке с напыленной углеродной пленкой-подложкой. Перед тем как поместить клетку под электронный микроскоп, производят экстрагирование до тех пор, пока на подложке не останется один цитоскелет или его субструктуры [45, 46]. Глубина резкости электронного микроскопа достаточно велика, и у сравнительно плоских клеток при умеренном увеличении можно увидеть весь клеточный «интерьер». Однако метод нанесения целого объекта обладает рядом недостатков; не самый последний из них — непривычный вид многих субклеточных элементов, изображения которых представляются в форме плоской проекции их трехмерных структур, а не в виде обычных двумерных поперечных срезов.

В результате развития техники без заливки смолой появился новый мощный метод, чрезвычайно полезный при изучении клеток, зараженных вирусом, — приготовление незалитого среза. В этом случае образец фиксируют, а затем пропитывают экстрагируемой «смолой» или воском [51]. Мы обнаружили, что для этой цели хорошо подходит диэтиленгликольдистеарат, но можно использовать также полиэтиленгликоль и метилакрилат [14]. Изображения, которые получают на этих срезах, очень сильно отличаются от обычных, поскольку даже на срезе толщиной 0,1 мкм имеется множество клеточных структур, которые оказываются полностью замаскированными при использовании обычной техники.

Итак, сначала клетки «обнажают», экстрагируя липиды неионными детергентами в буфере при физиологической ионной силе. Растворимые белки высвобождаются, и остается самоподдерживающийся переплетенный клеточный скелет. При последующей обработке смесью ионного и неионного детергентов либо 0,25 М сульфатом аммония удаляется цитоскелет. Хроматин удаляют с помощью нуклеаз и последующей элюции с повышением ионной силы. После этого остается ядерная сеть, или матрикс, вместе с промежуточными филаментами [22]. На рис. 11.1 схематически изображена процедура ступенчатой экстракции, при которой прекрасно сохраняется морфология и очень хорошо разделяются биохимические фракции, так что все клеточные белки



Рис. 11.1. Ступенчатая экстракция, позволяющая получить цитоскелетную основу и комплекс ядерного матрикса с промежуточными филаментами.

оказываются в одной из этих структурных фракций. На рис. 11.2 изображена клетка после всех описанных процедур экстракции, так, как она выглядит в электронном микроскопе при использовании метода нанесения целого объекта. Из этого рисунка видно, что структурный скелет после удаления липидов и растворимых белков по-прежнему поддерживает общую форму клетки и даже ее детальную морфологию. Клетка покрыта белковой оболочкой (пленкой), состоящей из белков плазматической мембраны,

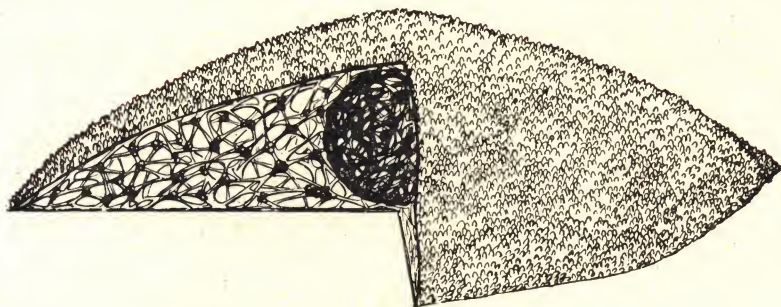


Рис. 11.2. Клетка после всех описанных в тексте процедур экстракции.

большая часть которых остается связанной со скелетной основой и после удаления липидов [5]. Эта плазматическая пленка содержит участки связывания полиовируса, а также, вероятно, других вирусов. В плазматической мембране иногда обнаруживаются вирус-специфические белки, такие как гликопротеин вируса Синдбис или белок *src* вируса саркомы Рауса, но в основном они удерживаются цитоскелетом в составе плазматической пленки. На рис. 11.2 показано также, как выглядит ядро после удаления хроматина и волокон RNP. Все ядерное пространство заполнено густой сетью белковых филаментов. Их морфология и биохимический состав совсем иные, чем у плазматических волокон.

На рис. 11.3 представлено несколько цитоплазматических структур при разном увеличении. На микрофотографиях отчетливо видны белковые волокна, в то время как с помощью обычной электронно-микроскопической методики удается получить лишь весьма приближенное представление о внутренних структурах клетки. Белковые волокна гетерогенны по своей морфологии и чрезвычайно сложны по составу. В процессе подготовки препаратов для электронной микроскопии микротрубочки могут деполимеризоваться (как в данном примере). Этот процесс удается предотвратить путем стабилизации препаратов таксолом.

Распространено ошибочное представление о том, что клеточный «скелет» состоит из актина, тубулина и белка промежуточных филаментов. На самом деле эти компоненты являются лишь частью скелетных структур; на микрофотографиях видно множество других переплетенных элементов. Анализ скелетных белков с помощью двумерного гель-электрофореза показывает, что в скелете и ядерном матриксе присутствует несколько сотен белков. Актин, тубулин и белок промежуточных филаментов — это очень важные компоненты, но они составляют всего лишь 10—15% массы скелета.

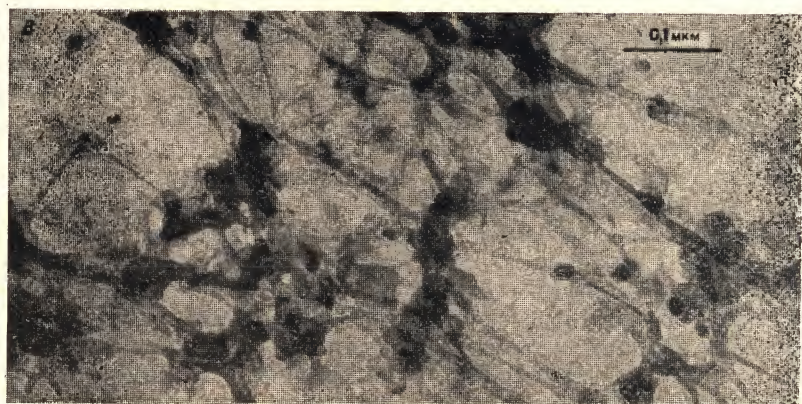
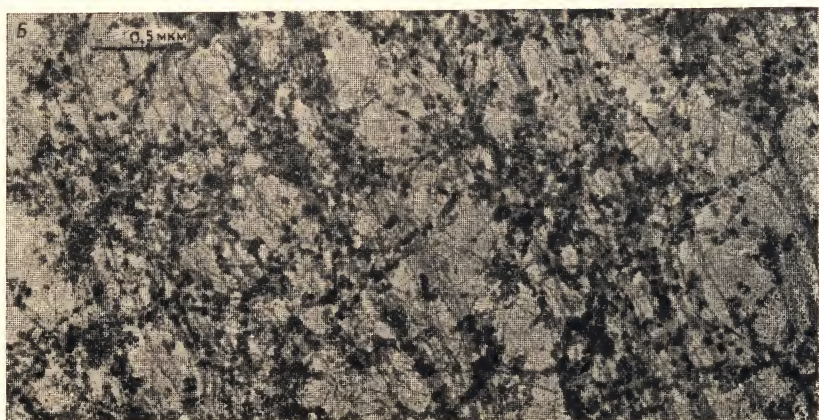
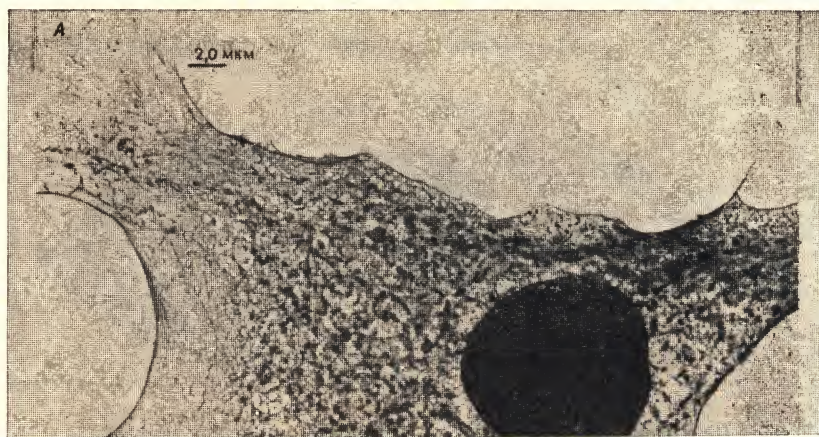


Рис. 11.3. Электронно-микроскопические фотографии цитоскелета, полученные без заливки в смолу. А. Низкое увеличение. Б. Среднее увеличение. В. Высокое увеличение.

Особый интерес для вирусологических исследований представляет визуализация ядерного матрикса [7, 18, 24, 28, 42]. Очень много споров вызвал вопрос о самом существовании этой структуры, главным образом из-за того, что с помощью обычной методики заливки среза не удавалось визуализировать чисто белковую сеть. На незалитом срезе ядерный матрикс виден совершенно отчетливо. На рис. 11.4 показаны два вида матрикса после удаления хроматина: первый с еще неудаленными волокнами РНК, второй — без них. Морфология и биохимический состав матрикса зависят в определенной степени от метода приготовления препарата. Нами была разработана методика сравнительно мягкой экстракции, в которой используются растворы с низкой ионной силой (0,25 М сульфат аммония) и которая обеспечивает полное удаление белков, связанных с хроматином [15, 23]. О действенности этой методики свидетельствует эффективное отделение компонентов ядра от других компонентов клетки, а сравнительно хорошее сохранение различных структур позволяет предположить, что такие мягкие процедуры могут оказаться полезными и для дальнейших исследований вирусов.

Метаболизм вирусов и клеточные структуры

Метаболизм вируса осуществляется не в любой области клетки, а в определенных компартментах. Это означает, что имеются какие-то структуры, упорядочивающие процессы, которые осуществляются при развитии вируса. Электронно-микроскопические данные свидетельствуют о том, что вирионы «тяготеют» к некоторым клеточным элементам. В обзоре [33] говорится о ранних наблюдениях, из которых следует, что метаболизм вируса связан с определенными клеточными структурами. В настоящее время появилась возможность экспериментально изучать взаимодействия между вирусом и клеточным каркасом, и в этом разделе мы опишем первые результаты таких исследований. Они базируются главным образом на данных, полученных при избирательной экстракции, но имеется и несколько электронных микрофотографий, позволяющих получить хотя бы приближенное представление о таких взаимосвязях.

Уже сейчас можно сформулировать несколько важных принципов. Оказалось, что метаболизм вирусных нуклеиновых кислот — репликация, транскрипция и трансляция мРНК — осуществляется при участии клеточных структур, цитоплазматических или ядерных. Для белковых компонентов вирусной «фабрики» характерно более разнообразное поведение. Оказалось, что существуют два совершенно разных способа упаковки вирусных структурных белков. В сборке вирусов, лишенных оболочки,

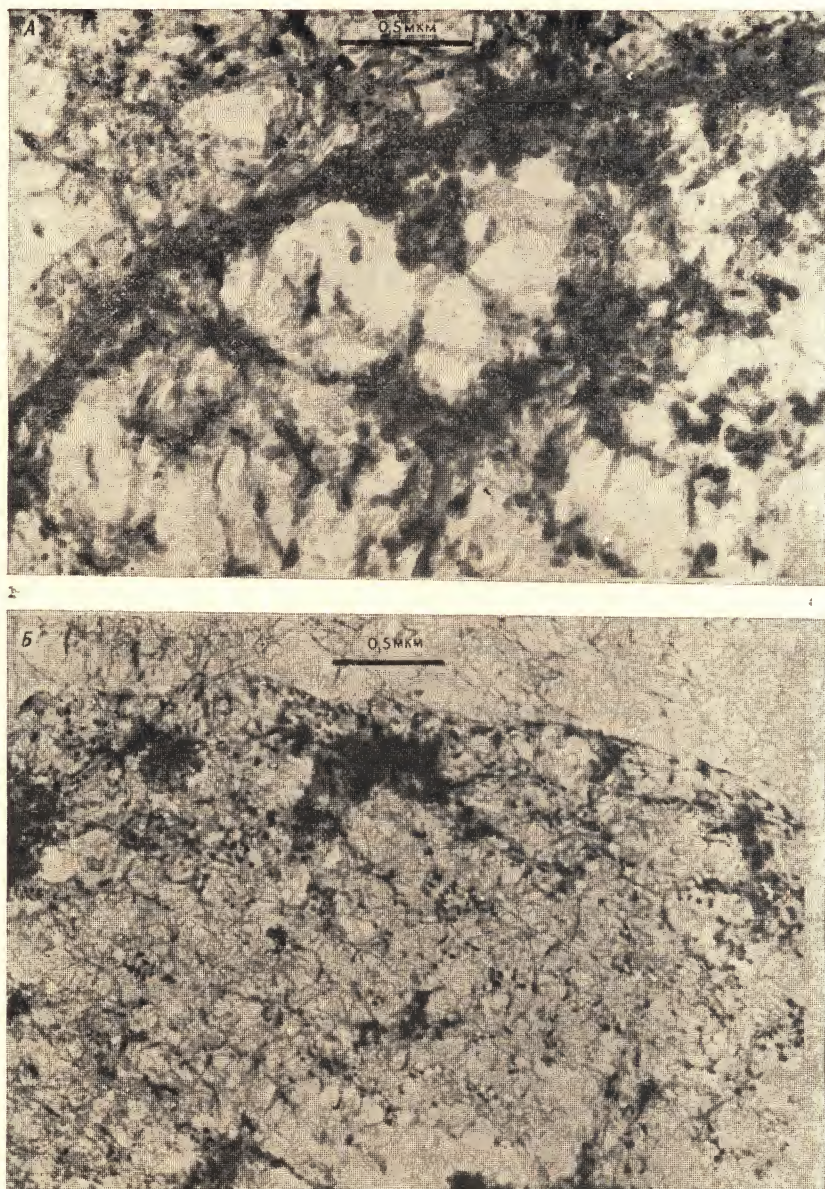


Рис. 11.4. Электронно-микроскопические фотографии среза ядерного матрикса с удаленным хроматином без заливки в смолу. А. Матрикс с волокнами RNP. Б. Только матриксные белки.

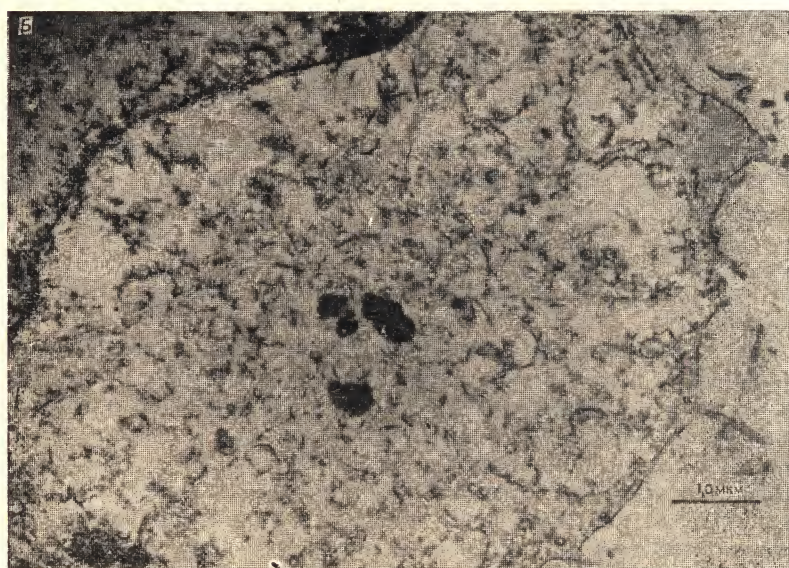
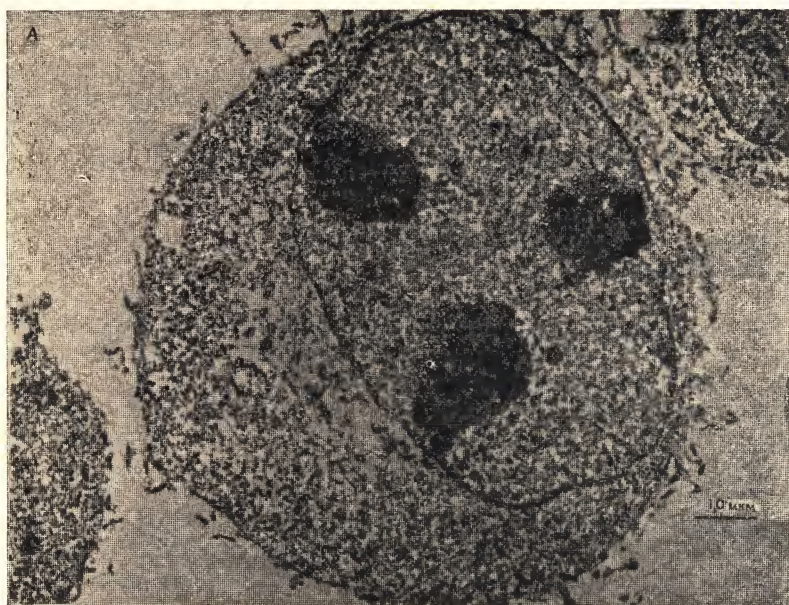
по-видимому, участвуют растворимые белки, а сборка вирусов, снабженных оболочкой, осуществляется иначе. Очевидно, у таких вирусов, как VSV и HSV, структурные белки не находятся в растворимой фазе и эти вирусы используют «сборочные механизмы» клетки в большей степени. Неструктурные вирусные белки, такие как полимеразы, по-видимому, ведут себя иначе.

Полиовирус — цитоплазматический вирус, лишенный оболочки

Одной из первых систем, на которой были проверены возможности использования избирательной экстракции в биохимических и морфологических исследованиях, были клетки HeLa, зараженные полиовирусом [31]. Вирусная РНК, специфически меченая в обработанных актиномицином клетках, была прикреплена к скелетной основе как во время репликации, так и при ее функционировании в качестве мРНК в полирибосомах. Полностью связанными оказались геномная и матричная 35S-РНК и двухцепочечные 20S-формы. Растворимая вирусная РНК обычно появляется после лаг-периода длительностью 60 мин в виде 135S-частиц, обладающих биохимическими свойствами зрелых вирионов. В присутствии гуанидина, который препятствует выходу РНК из места репликации, блокируется высвобождение 35S-РНК из скелета [13, 27]. Высвобождение вирусной РНК начинается непосредственно перед созреванием частицы или совпадает с ним по времени.

В отличие от метаболизма РНК процессинг полиовирусного белка довольно сложен [29, 41]. Исходный крупный полипротеин претерпевает несколько стадий протеолитического расщепления. При этом образуются три группы белков: белки капсида, или VP, РНК-полимераза и белки, участвующие в формировании мембранных везикул, характерных для поздней стадии развития вируса.

Результаты опытов по разделению белков на растворимые и связанные со скелетом фракции далеко не однозначны. К сожалению, это характерно для применения этого метода в вирусологических исследованиях. Большинство белков встречается как в связанной, так и в свободной форме [49]. При этом большинство белков капсида быстро высвобождается из скелетной сети, тогда как примерно половина всех предшественников полимераз остаются связанными со скелетом, в котором, по-видимому, и локализуется активная форма полимеразы. Белки везикул в основном (но не полностью) остаются связанными с остовом после обработки детергентом; возможно, они участвуют в изменении архитектуры клетки.



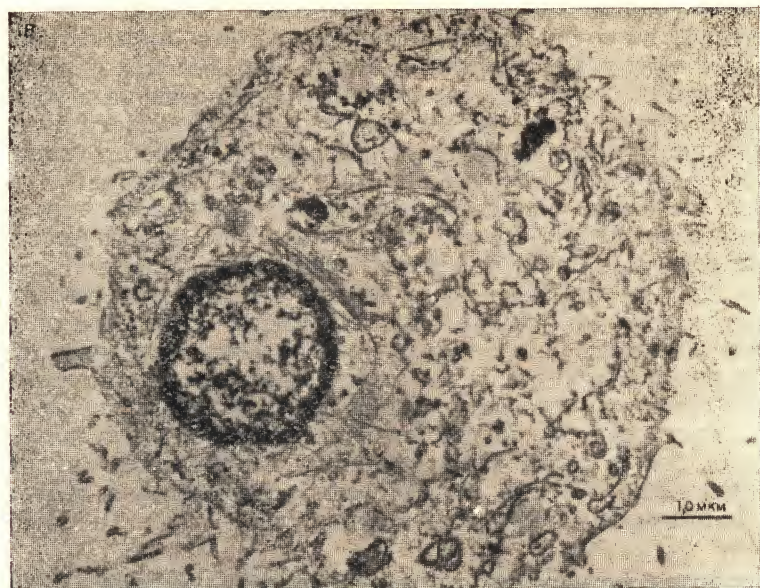


Рис. 11.5. Электронно-микроскопические фотографии залитого эпоном среза клеток HeLa, обработанных детергентом. А. Незараженная клетка. Б. Ранняя стадия полиовирусной инфекции. В и Г. Поздние стадии полиовирусной инфекции.

Электронная микроскопия интактных зараженных клеток оказалась не очень информативной; удалось лишь установить, что цитопатический эффект, который наблюдается у зараженных клеток, включает образование многочисленных маленьких везикул, содержащих зрелые вирионы [19]. Несколько более информативной была одна из ранних работ на срезах, залитых эпоном, цель которой состояла в исследовании обработанной детергентом скелетной основы зараженных клеток. В этой работе были выявлены некоторые последствия вирусной инфекции для цитоскелета [31]. После удаления растворимых белков стала видна (хотя и не так четко, как в случае незалитых срезов) сильно перестроенная сеть филаментов. Примеры таких срезов представлены на рис. 11.5. Заметны значительные нарушения промежуточных филаментов, а на апикальных проекциях видно, что они коллапсируют на ядро. Как и ожидалось, большинство связанных со скелетом полирибосом исчезло, поскольку вирус подавляет синтез белка клетки-хозяина. Вместо этого видны огромные полиовирусные полирибосомы, связанные с белковыми «обломками» мембранных везикул.

Вирус везикулярного стоматита — цитоплазматический РНК-содержащий вирус с оболочкой

Из разных классов вирусов, снабженных оболочкой, лишь один рабдовирус — вирус везикулярного стоматита (VSV) — был изучен с точки зрения его связей с цитоскелетом. Полярный характер почкования VSV и совершенно иное поведение в этом отношении вируса гриппа говорят о том, что механизмы транспорта нуклеокапсида в клетке весьма специфичны [43]. Однако стратегия, которой подчиняется репликация, сборка и почкование цитоплазматических вирусов, снабженных оболочкой, примерно одинакова.

VSV — это вирус, содержащий минус-цепь 42S-РНК, которая заключена в структуру, построенную из пяти белков. РНК связана с белками нуклеокапсида N и NS и с небольшим количеством высокомолекулярной РНК-полимеразы L [2, 20]. Белок матрикса М является наружным по отношению к нуклеокапсиду, но внутренним по отношению к вирусной оболочке. Наружная оболочка вируса формируется из G-белка и липидов клеточной плазматической мембраны. Сборка вируса осуществляется в строго определенной последовательности, при этом N-, NS- и L-белки, связываясь с РНК при формировании нуклеокапсида, присоединены к скелету. Затем капсид связывается с М-белком и вскоре «одевается» в плазматическую мембрану, в которую встроен G-белок.

Во время трансляции мРНК VSV, как и РНК всех изученных

вирусов, связаны с цитоскелетом [16]. Это же относится и к мРНК для G-белка, которая присоединена к ШЭР. Поскольку после разрушения плазматической мембраны под действием детергента тритона X-100 скелетные структуры сохраняются, можно сказать, что ШЭР ведет себя как часть цитоскелета и, вероятно, содержит белковую основу, которая и остается после удаления липидов детергентом.

Наиболее убедительным свидетельством того, что для трансляции мРНК необходима ее связь с цитоскелетом, является синтез белка VSV [16]. Новосинтезированные РНК VSV проходят через полирибосомы в течение 30—40 мин, и все это время они остаются связанными с цитоскелетом. Затем РНК отсоединяется от скелета, и трансляция прекращается. То, что молекулы мРНК в свободном состоянии в цитоплазме не транслируются, является общим наблюдением, однако причинно-следственная связь между присоединением мРНК к цитоскелету и трансляцией еще не установлена.

Процесс сборки нуклеокапсида VSV детально исследован в работе [17] с помощью химических сшивок. Он существенно отличается от сборки вирусов, не имеющих оболочки, таких как полиовирус. Во всяком случае, белок N от момента синтеза до сборки остается связанным с элементами цитоскелета.

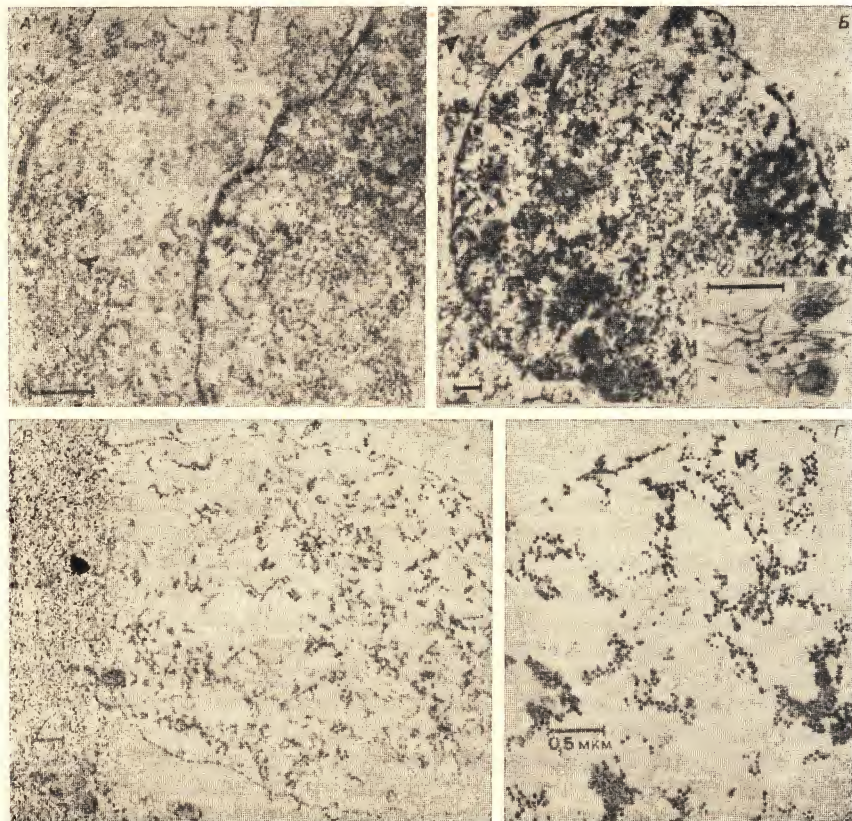
Связывание белков VSV с цитоструктурами удается обнаружить прежде всего с помощью метода импульсной метки с «чейзом» (последующим разведением метки избытком немеченого предшественника). Полученные результаты иллюстрируют все преимущества и недостатки использования вирусов в качестве модельных систем для изучения клеточного поведения. Соответствующим образом обработанные клетки, зараженные VSV, синтезируют лишь пять белков. Это позволяет детально проанализировать все этапы сборки вируса. Однако, как и в случае большинства вирусов, белки VSV продуцируются в избытке, и это приводит к метаболическому тупику. Около половины синтезированных белков VSV находится в свободном состоянии в растворимой фазе цитоплазмы. С помощью сшивок показано, что они так никогда и не включаются в вирусные структуры.

В нуклеокапсиды входит та часть белков N, NS и L, которая связана с цитоскелетом. С помощью метода химических сшивок с последующим электрофорезом белков показано, что молекулы этих белков контактируют друг с другом. Для связанного с цитоструктурой белка N вначале обнаруживается диффузная картина взаимодействия с ближайшими соседями, являющимися, вероятно, структурными элементами клетки. В течение последующих 40 мин эта картина постепенно меняется и наконец вырисовывается характерная картина ковалентных сшивок, основной особенностью которой является наличие димеров N—N, обнару-

живаемых в нуклеокапсидах зрелых вирионов. Имеется также некоторое количество сшивок белка N с белками, отсутствующими в зрелом вирионе; очевидно, эти сшивки удерживают нуклеокапсид в цитоархитектуре. Интересно, что для встраивания белка N в вирус во время сборки требуется, чтобы белковый синтез продолжался. Аналогичное условие, по-видимому, выполняется во время сборки цитоскелета незараженной клетки [25].

SV40 — ядерный вирус, лишенный оболочки

Папилломавирусы (например, SV40) представляют собой довольно простую модельную систему, позволяющую изучать события, связанные с ядром, и ядерно-цитоплазматические взаимодействия, которые имеют место во время развития ядерных вирусов. Бен-Зе'ев и группа авторов из Вейцмановского института провели чрезвычайно интересное исследование связи метаболиз-



ма SV40 с цитоструктурами. Они обнаружили, что зрелые вирионы, содержащие ДНК в устойчивой к ДНКазе форме, остаются связанными с ядерным матриксом даже после удаления хроматина [3]. Действительно, микрофотографии стандартных заливтых в эпон срезов показывают, что вирионы разбросаны по всему пространству ядра, из которого удален хроматин, хотя никаких поддерживающих структур не видно (рис. 11.6, А—Г). Более поздние исследования ядер с удаленным хроматином методом нанесения целого объекта без заливки показали, что вирионы присоединены к волокнам ядерного матрикса (рис. 11.6, Д). Очень полезным при исследовании этого и других ядерных вирусов мог бы стать метод тонких срезов без заливки в смолы, который позволяет увидеть достаточно четко ядерный матрикс (рис. 11.4).

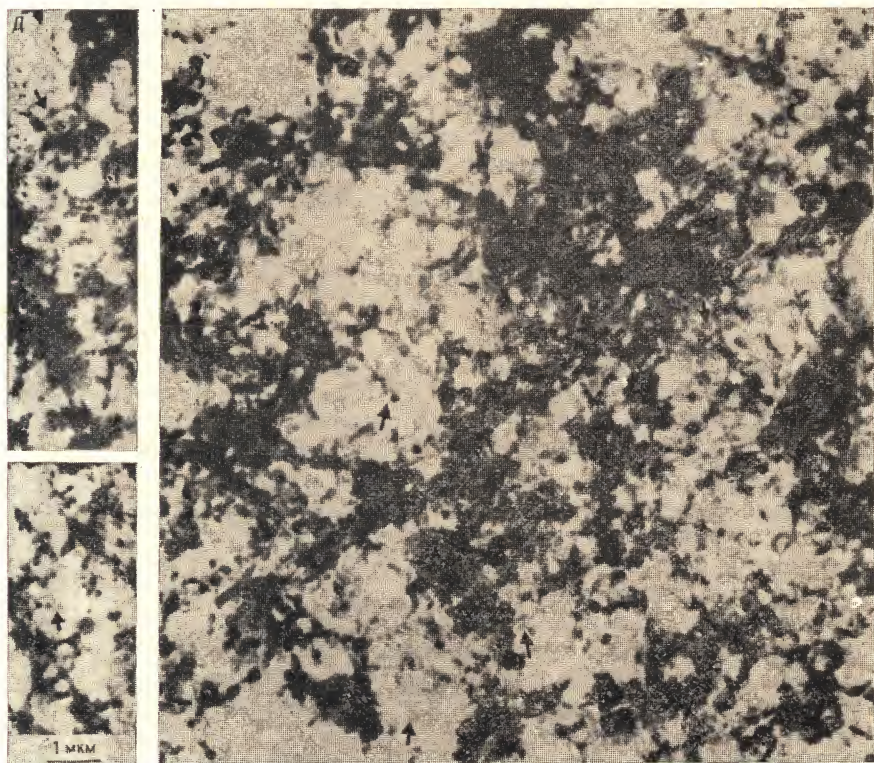


Рис. 11.6. Ядерный матрикс клеток, зараженных SV40. А—Г. Срезы, залитые эпоном. Д. Микрофотография, полученная методом нанесения целого объекта без заливки смолой. Стрелки указывают на вирионы.

Бен-Зе'ев и др. [1] изучили также транскрипцию РНК SV40. Они показали, что транскрипты связываются с ядерным матриксом аналогично транскриптам незараженных клеток. Благодаря простоте вирусной транскрипции авторы смогли проанализировать метаболизм РНК весьма детально. Опыты *in vivo* и *in vitro* показывают, что поздние вирусные транскрипты образуются следующим образом. Сначала синтезируется «аттенуаторная» РНК, состоящая из 94 нуклеотидов, которая не связывается с ядерным матриксом и отщепляется от конечных транскриптов. РНК, синтезируемая после аттенуаторной, связывается с ядерным матриксом, где она, по-видимому, подвергается сплайсингу, в результате которого образуется зрелая информационная РНК.

мРНК SV40 [как $\text{poly(A}^+)$, так и $\text{poly(A}^-)$] связана с цитоскелетом [6]. Она появляется на цитоскелете, минуя растворимую фазу. Это означает, что от ядра до цитоплазмы мРНК может перемещаться, будучи связанной со структурными элементами клетки. Интересно, что при этом время жизни молекул $\text{poly(A}^-)$, транскрибируемых с различных областей ДНК, больше, чем время жизни молекул $\text{poly(A}^+)$. Как и мРНК VSV, мРНК SV40 временно связана с цитоскелетной основой. Через несколько часов она высвобождается в растворимую фазу, но там больше не транслируется. Следовательно, для трансляции необходимо, чтобы мРНК была связана со скелетной основой.

Аденовирус — крупный ядерный вирус, лишенный оболочки

О связи метаболизма аденовируса с элементами скелета клетки известно сравнительно мало. Это, в частности, объясняется тем, что аденовирусные белки образуются в избыточном количестве. Фракционирование зараженных аденовирусом клеток на растворимую фракцию, цитоскелет, хроматин и ядерный матрикс показывает, что, хотя во многих отношениях результаты не отличаются от случая незараженных клеток, тем не менее в каждой фракции в большом количестве присутствуют вирусные белки (неопубликованные данные). По-видимому, для вирусного метаболизма существенны лишь некоторые из этих белков, но о механизмах транспорта и сборки частицы в настоящее время известно мало. Судя по некоторым ранним микрофотографиям, зрелые аденовирусы так же хорошо связываются с ядерным матриксом, как и папилломавирусы. Аденовирусная РНК также присоединяется к ядерному матриксу, но активная аденовирусная мРНК связана с цитоскелетом в составе полирибосом [47].

Взаимодействие аденовируса с системами клеточных филаментов — микротрубочками — исследовалось *in vivo* и *in vitro*

Люфтигом и др. [34, 35]. В этих пионерских работах, где применялась электронная микроскопия залитых тонких срезов, было показано, что аденовирус, по-видимому, связывается с цитоплазматическими микротрубочками. Обнаружилось также, что *in vitro* частицы аденовируса связываются с очищенными (собранными *in vitro*) микротрубочками. Значение такого связывания пока неясно; известно только, что микротрубочки причастны к транспорту и скачкообразным перемещениям органелл. Такие опыты *in vitro* помогают наметить пути будущих подходов к изучению биохимии связывания вирионов с субклеточными структурами.

Вирус герпеса — ядерный вирус, снабженный оболочкой

Вирус герпеса активно использует клеточные структуры. Этот крупный ДНК-содержащий вирус собирается в ядре, а затем почкуется через ядерную и далее через плазматическую мембрану. Давно известно, что архитектура зараженной клетки-хозяина претерпевает радикальную перестройку, по-видимому, адаптированную к созреванию вируса. Эта перестройка включает маргинацию хроматина и значительную реорганизацию ядерной оболочки. Чтобы выявить связанные с клеточными структурами стадии развития вируса герпеса, использовался описанный выше метод нанесения целого объекта без заливки с последующим биохимическим фракционированием.

Репликация и транскрипция вируса герпеса происходят в ядре, а трансляция информационной РНК — в цитоплазме, при этом РНК присоединена к цитоскелету [4, 30, 40]. После трансляции белки проникают в ядро, где в комплексе с ядерным матриксом происходит сборка вирусной частицы [8, 21]. Миграция двух вирус-специфических белков, ICP 5 и ICP 8, из цитоплазмы в ядро свидетельствует о существовании двух разных путей сборки, о которых говорилось ранее, — для вирусов, лишенных оболочки, и для вирусов с оболочкой. ICP 5 — это главный белок капсида. Своей миграцией от места синтеза к месту сборки вирусной частицы он напоминает N-белок VSV [4, 40]. Как показывает клеточное фракционирование, капсидный белок сначала связывается с цитоскелетом, а затем через некоторое время появляется в ядре, где в конце концов встраивается в вирусную частицу. По-видимому, это перемещение не сопровождается выходом белка в растворимую фазу, как у белка N VSV. Интересно отметить, что ингибирование белкового синтеза блокирует перемещение белка ICP 5 точно так же, как миграцию белка N VSV и движение элементов цитоскелета от места их синтеза в незараженной клетке. Необходимость продолжения белкового синтеза для перемещения связанных со структурными сетями белков может служить индикатором такого способа транспорта и сборки.

В отличие от ICP 5 некапсидный ДНК-связывающий белок ICP 8 быстро перемещается от места синтеза к месту связывания в ядре (из комплекса с ДНК этот белок высвобождается путем обработки ДНКазой и соевым раствором). Он отличается от ICP 5 и тем, что в норме не связывается с ядерным матриксом, а ингибирование белкового синтеза не влияет на его миграцию. Как ни странно, этот ДНК-связывающий белок, по-видимому, все-таки связывается с ядерным матриксом, когда блокируется синтез вирусной ДНК, но если синтез ДНК возобновляется, то он покидает матрикс и связывается с вирусной ДНК [39a].

Как показывают связывание ICP 5 и электронные микрофотографии ядерного матрикса с удаленным хроматином, полученные Бен-Зе'евом и др. методом нанесения целого объекта, нуклеокапсиды созревающих герпесвирусов прочно прикреплены к ядерному матриксу. На микрофотографиях видна плотная сеть волокон ядерного матрикса с присоединенными к ним нуклеокапсидами вируса герпеса (рис. 11.7).

Общие представления об архитектурных аспектах метаболизма вирусов

В этой небольшой главе мы попытались дать читателю общее представление о новой увлекательной области исследований — связи между метаболизмом вирусов и клеточной архитектурой. По этому поводу имеется еще очень много литературных данных. Один пример такого рода — связывание активной формы белка src RCV с цитоскелетом [11, 12]. Высказывалось предположение, что этот белок — тирозинкиназа — локализуется на плазматической мембране [50]. В таком случае связывание его со скелетной основой должно приводить к включению этого белка в плазматическую оболочку. Другой трансформирующий белок, который удерживается скелетной основой, — это активная форма среднего Т-антигена вируса полиомы. Его неактивная форма обнаруживается в растворимой фазе [44]. Возможно, такие различия между связанными со скелетом и свободными вирусными белками носят универсальный характер. Как сообщалось в работе [10], большой Т-антиген вируса полиомы в форме, связанной с матриксом, фосфорилирован сильнее, чем в растворимой форме.

Тот факт, что мы можем теперь изучать важные аспекты метаболизма вирусов с точки зрения связи его с различными клеточными структурами, позволяет подойти к изучению вопросов, казавшихся ранее неразрешимыми: к установлению местоположения вирусных «фабрик», к выяснению причины четко выраженной полярности почкования многих вирусов, снабженных

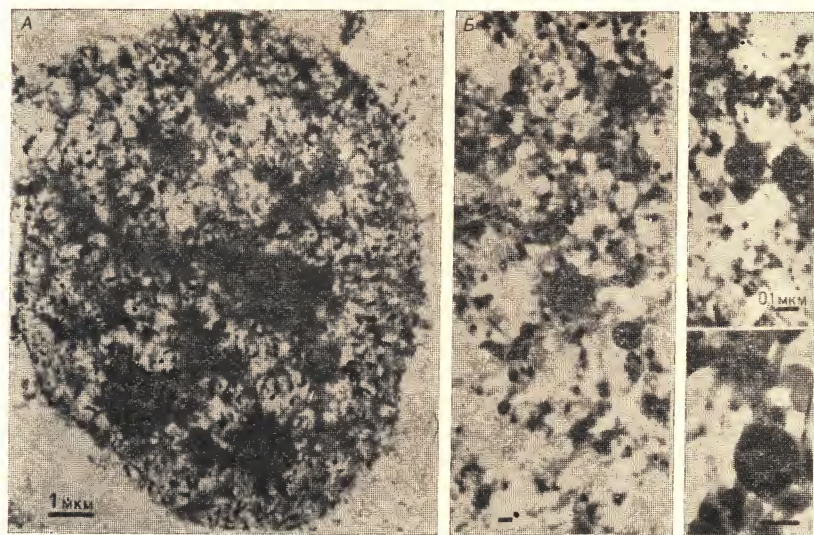


Рис. 11.7. Ядерный матрикс клеток, зараженных вирусом герпеса. Микрофотографии получены методом нанесения целого объекта.

оболочкой, и, конечно, к распределению ядерных и цитоплазматических вирусов по компартментам. Телеологические аспекты более трудны для изучения, поскольку о причинной связи клеточных процессов с клеточной архитектурой мы знаем очень мало. Представляется очевидным, что упаковка клеточной ДНК млекопитающих, длина которой составляет ~ 1 м, внутри ядра размером 5 мкм была бы невозможна, если бы хроматин имел беспорядочную структуру; по-видимому, существует некий каркас, делающий возможным такую плотную упаковку. Аналогично сложная региональная специализация клеточных сетей и полярность клетки предполагают наличие расположенных определенным образом специфических центров белкового синтеза для тех белков, которые присоединены к структурному скелету. Связь вирусного метаболизма с клеточными структурами, очевидно, построена на использовании их в качестве мишеней; при этом высокоспециализированные клеточные механизмы используются вирусом для его воспроизведения.

Связь метаболизма вирусов с архитектурой клетки — новая область, которая ждет своих исследователей. Уже имеются соответствующие морфологические и биохимические подходы, и для освоения этой новой области вирусологии может быть использован весь арсенал современных биохимических методов.

Литература

1. *Abulafia R., Ben-Ze'ev A., Hay N., Aloni Y.* (1984). Control of late simian virus 40 transcription by the attenuation mechanisms and transcriptionally active ternary complexes are associated with the nuclear matrix, *J. Mol. Biol.*, **172**, 467—487.
2. *Atkinson P., Moyer S., Summers D.* (1976). Assembly of vesicular stomatitis virus glycoprotein and matrix protein into HeLa cell plasma membranes, *J. Mol. Biol.*, **102**, 613—631.
3. *Ben-Ze'ev A., Abulafia R., Aloni Y.* (1982). SV40 virions and viral RNA metabolism are associated with cellular substructures, *EMBO J.*, **1**, 1225—1231.
4. *Ben-Ze'ev A., Abulafia R., Bratosin S.* (1983). Herpes simplex virus assembly and protein transport are associated with the cytoskeletal framework and the nuclear matrix in infected BSC-I cells, *Virology*, **129**, 501—507.
5. *Ben-Ze'ev A., Duerr A., Solomon F., Penman S.* (1979). The outer boundary of the cytoskeleton: a lamina derived from plasma membrane proteins, *Cell*, **17**, 859—865.
6. *Ben-Ze'ev A., Horowitz M., Skolnik H., Abulafia R., Laub O., Aloni Y.* (1981). The metabolism of SV40 RNA is associated with the cytoskeletal framework, *Virology*, **111**, 475—487.
7. *Berezney R., Coffey D. S.* (1975). Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA, *Science*, **189**, 291—293.
8. *Bibor-Hardy V., Pouchelet M., St. Pierre E., Herzberg M., Simard R.* (1982). The nuclear matrix is involved in herpes simplex virogenesis, *Virology*, **121**, 296—306.
9. *Brown S., Levinson W., Spudich J. A.* (1976). Cytoskeletal elements of chick embryo fibroblasts revealed by detergent extraction, *J. Supramol. Struct.*, **5**, 119—130.
10. *Buckler White A. J., Humphrey G. W., Pigiet V.* (1980). Association of polyoma T antigen and DNA with the nuclear matrix from lytically infected 3T6 Cells, *Cell*, **22**, 37—46.
11. *Burr J., Lee S., Buchanan J.* (1981). In situ phosphorylation of proteins associated with the cytoskeleton of chick embryo fibroblasts. In: *Protein Phosphorylation*, Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, Vol. 8, pp. 1217—1232.
12. *Burr J., Dreyfuss G., Penman S., Buchanan J.* (1980). Association of the src gene product of RSV with CSK structures of CEF's, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3484—3488.
13. *Caligiuri L. A., Tamm I.* (1968). Action of guanidine on the replication of poliovirus RNA, *Virology*, **35**, 408—417.
14. *Capco D., Wan K., Penman S.* (1982). The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition, *Cell*, **29**, 847—858.
15. *Capco D., Krochmalnic G., Penman S.* (1984). A new method of preparing embedment-free sections for transmission electron microscopy: applications to the cytoskeletal framework and other three-dimensional networks, *J. Cell Biol.*, **98**, 1878—1885.
16. *Cervera M., Dreyfuss G., Penman S.* (1981). Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and VSV-infected HeLa cells, *Cell*, **23**, 113—120.
17. *Chatterjee P., Cervera M., Penman S.* (1984). Formation of vesicular stomatitis virus nucleocapsid cytoskeleton framework-bound N protein: possible model for structure assembly, *Mol. Cell Biol.*, **14**, 2231—2234.
18. *Comings D. E., Okada T. A.* (1976). Nuclear protein III. The fibrillar nature of the nuclear matrix, *Exp. Cell Res.*, **103**, 341—360.
19. *Dales S., Eggers J., Tamm I., Palade G.* (1965). Electron microscopic study of the formation of poliovirus, *Virology*, **26**, 379—389.
20. *Dubovi E., Wagner R.* (1977). Spatial relationships of the proteins of vesicu-

- lar stomatitis virus: induction of reversible oligomers by cleavable protein cross-linkers and oxidation, *Virology*, **22**, 500—509.
21. *Fenwick M. L., Walker M. J., Patkevich J.* (1978). On the association of virus proteins with the nuclei of cells infected with herpes simplex virus, *J. Gen. Virol.*, **39**, 519—529.
22. *Fey E., Wan K., Penman S.* (1984). Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: Three-dimensional organization and protein composition, *J. Cell Biol.*, **98**, 1973—1984.
23. *Fey E., Penman S.* RNA Protein NM-IF (submitted).
24. *Fisher P. A., Berrios M., Blobel G.* (1982). Isolation and characterization of a proteinaceous subnuclear fraction composed of nuclear matrix, peripheral lamina, and nuclear pore complexes from embryos of *Drosophila melanogaster*, *J. Cell Biol.*, **92**, 674—686.
25. *Fulton A., Wan K., Penman S.* (1980). The spatial distribution of polyribosomes in 3T3 cells and the associated assembly of proteins in the skeletal framework, *Cell*, **20**, 849—857.
26. *Hall C.* (1953). *Introduction to Electron Microscopy*, McGraw-Hill, New York.
27. *Huang A. S., Baltimore D.* (1970). Initiation of polysome formation in poliovirus-infected HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **47**, 275—291.
28. *Jackson D. A., McCready S. J., Cook P. R.* (1981). RNA is synthesized at the nuclear cage, *Nature*, **292**, 552—555.
29. *Kitamura N., Semler B. L., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler C. J., Dornier A. J., Emini E. A., Hanecak R., Lee J. J., van der Werf S., Anderson C. W., Wimmer E.* (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA, *Nature*, **291**, 547—553.
30. *Knipe D., Spang A.* (1982). Definition of a series of stages in the association of two herpes viral proteins with the cell nucleus, *J. Virol.*, **43**, 314—324.
31. *Lenk R., Penman S.* (1979). The cytoskeletal framework and poliovirus metabolism, *Cell*, **16**, 289—301.
32. *Lenk R., Ransom L., Kaufmann V., Penman S.* (1977). A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells, *Cell*, **10**, 67—78.
33. *Luftig R. B.* (1982). Does the cytoskeleton play a significant role in animal virus replication? *J. Theor. Biol.*, **99**, 173—191.
34. *Luftig R., Weihsing R.* (1975). Adenovirus binds to rat brain microtubules in vitro, *J. Virol.*, **16**, 696—706.
35. *Luftig R., McMillan P., Wetherbee J., Weihsing R.* (1977). Increased visualization of microtubules by an improved fixation procedure, *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 175—187.
36. *Nash R. E., Puvion E., Bernhard W.* (1975). Perichromatic fibrils as components of extranucleolar RNA, *J. Ultrastruct. Res.*, **53**, 395—405.
37. *Penman S., Capco D., Fey E., Chatterjee P., Reiter T., Ermish S., Wan K.* (1983). The three-dimensional structural networks of cytoplasm and nucleus: function in cells and tissue. In: *Modern Cell Biology*, Vol. 2, pp. 385—415, Alan Liss, New York.
38. *Penman S., Fulton A., Capco D., Ben-Ze'ev A., Wittelsberger S., Tse C.* (1981). Cytoplasmic and nuclear architecture in cells and tissues: form, function and mode of assembly, *Cold Spring Harbor S Symp. Quant. Biol.*, **17**, 1013—1027.
- 38a. *Porter K. R., Claude A., Fullam E. F.* (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy, *J. Exp. Med.*, **81**, 233—246.
39. *Puvion E., Bernhard W.* (1975). Ribonucleoprotein components in liver cell nuclei as visualized by cryoultramicrotomy, *J. Cell Biol.*, **67**, 200—214.
- 39a. *Quinlan M., Chenard L. B., Knipe D.* (1984). The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication, *Cell*, **36**, 857—868.

40. *Quinlan M., Kriple D.* (1983). Nuclear localization of herpesvirus proteins: potential role for the cellular framework, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 315—324.
41. *Rueckert R. R.* (1978). *The Molecular Biology of Picornaviruses*, Plenum Press, New York and London.
42. *Robinson S. I., Nelkin B. D., Vogelstein B.* (1982). The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells, *Cell*, **28**, 99—106.
43. *Rodriquez-Boudoin E., Sabatini D. D.* (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5071—5075.
44. *Schaffhausen B., Dorai H., Arakere G., Benjamin T.* (1982). Polyoma virus middle T antigen: relationship to cell membranes and apparent lack of ATP-binding activity, *Mol. Cell Biol.*, **2**, 1187—1198.
45. *Schliwa M.* (1982). Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks, *J. Cell Biol.*, **92**, 79—91.
46. *Schliwa M., Blerkom J. Van* (1981). Structural interaction of cytoskeletal components, *J. Cell Biol.*, **90**, 222—235.
47. *Van Venrooij W., Sillekeus P., Van Eekelin C., Reinder R.* (1981). On the association of mRNA with the cytoskeleton in uninfected and adenovirus-infected human KB cells, *Exp. Cell Res.*, **135**, 79—91.
48. *Webster R. E., Henderson D., Osborn M., Weber K.* (1978). Three-dimensional electron microscopical visualization of the cytoskeleton of animal cells: Immunoferritin identification of actin- and tubulin-containing structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5511—5515.
49. *Weed H., Penman S.* Association of the RNA and protein of replicating poliovirus with the cytoskeletal framework of polio-infected HeLa cells (in preparation).
50. *Wellingham M., Jay G., Pastan I.* (1979). Localization of the ASV src gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry, *Cell*, **18**, 125—134.
51. *Wolosewick J. J.* (1980). The application of polyethylene glycol (PEG) to electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **86**, 675—681.
52. *Wolosewick J. J., Porter K. R.* (1976). Stereo high-voltage electron microscopy of whole cells of the human diploid line, WI-38, *Am. J. Anat.*, **147**, 303—321.

Трансформация и онкогенез: ДНК-содержащие вирусы

Морис Грин¹

Введение и краткий обзор

Вирусология опухолей

Исследование опухолеродных вирусов занимает ведущее место в биомедицинских науках по двум причинам. Во-первых, эти вирусы обладают способностью трансформировать клетки *in vitro* и индуцировать опухоли у лабораторных животных. При этом некоторые вирусы вызывают у животных рак в естественных условиях, и логично предположить, что они играют роль в этиологии рака человека. Вопрос о том, имеет ли отношение экспрессия генов, кодируемых опухолеродными вирусами, к этиологии рака человека, усиленно изучался последние 15 лет. В результате этих исследований идентифицированы опухолеродные вирусы и клеточные гомологи онкогенов ретровирусов, которые, очевидно, причастны к раковым заболеваниям человека, в том числе: а) ДНК-содержащие опухолеродные вирусы человека — вирусы Эпштейна — Барр, гепатита В и несколько недавно открытых вирусов папиллом; б) ретровирусы человека — вирусы Т-клеточного лейкоза; в) раковые «онкогены» человека (гены, которые мутируют, перестраиваются или активируются при некоторых видах рака), являющиеся гомологами онкогенов *ras* и *myc*, трансдуцируемых онкогенными вирусами животных.

Во-вторых, опухолеродные вирусы являются достаточно простой и адекватной модельной системой для исследования молекулярной биологии эукариотических клеток, особенно для анализа молекулярных основ клеточной трансформации. Репликация генома и экспрессия генов опухолеродных вирусов осуществляются главным образом с помощью клеточных ферментов и механизмов. Таким образом, изучая процессы репликации вирусной ДНК, транскрипции, процессинга РНК и белкового синтеза, исследователь имеет возможность понять, как протекают эти процессы в эукариотической клетке. Однако главное преимущество опухолеродных вирусов по сравнению с другими — это их уникальная способность трансформировать клетки, используя для

¹ Maurice Green, Institute for Molecular Virology, St. Louis University Medical Center, St. Louis, Missouri 63110.

этой цели информацию, закодированную лишь в нескольких трансформирующих генах. На вирусологию опухолеродных вирусов возлагают большие надежды, поскольку считается, что если мы установим функции трансформирующих белков, кодируемых вирусными трансформирующими генами, то сможем уяснить и природу клеточной трансформации и злокачественного роста на молекулярном уровне.

Последнее время благодаря развитию новых методов молекулярной биологии, таких как молекулярное клонирование и быстрое секвенирование ДНК, а также благодаря появлению систем для изучения *in vitro* синтеза нуклеиновых кислот, транскрипции и трансляции объем исследований, проводимых на опухолеродных вирусах, стремительно возрастает. В этой главе мы обсудим онкогенные свойства пяти семейств опухолеродных ДНК-содержащих вирусов и изложим существующие в современной молекулярной биологии представления о том, каким образом трансформирующие гены опухолеродных вирусов осуществляют трансформацию клетки.

Классификация ДНК-содержащих опухолеродных вирусов

Многие ДНК-содержащие вирусы животных и человека могут либо трансформировать нормальные культивируемые клетки в злокачественные, либо индуцировать опухоли при введении лабораторным животным, либо осуществлять и то и другое одновременно. Некоторые вирусы вызывают у своих хозяев рак в естественных условиях. Эти вирусы называют *ДНК-содержащими опухолеродными вирусами* и относят их к пяти разным семействам (табл. 12.1). 1. *Полиомавирусы*: хорошо изученный обезьяний вирус 40 (SV40), вирус полиомы мыши (Рy) и вирусы человека ВК (BKV) и JC (JCV). 2. *Папилломавирусы*: 16 вирусов папилломы человека (HPV) и множество папилломавирусов животных (полиома- и папилломавирусы сначала были отнесены к одному семейству — Рarovaviridae, но проведенный недавно анализ нуклеотидной последовательности ДНК вируса папилломы показал, что эти группы вирусов, очевидно, образуют два разных семейства). 3. *Аденовирусы* (Ad): 37 вирусов человека, из которых хорошо изучены аденовирусы 1—31, образующие пять разных трансформирующих групп, и множество аденовирусов животных, например 24 обезьяньих вируса и девять вирусов крупного рогатого скота. 4. *Герпесвирусы*: вирусы простого герпеса человека типов 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2), цитомегаловирус человека (HCMV), вирус Эпштейна — Барр (EBV) и онкогенные герпесвирусы приматов, лошадей, кур, лягушек и кроликов. 5. *Вирусы, подобные вирусу гепатита В*: вирусы гепатита В че-

Таблица 12.1. ДНК-содержащие опухолеродные вирусы

Полиомавирусы

- Обезьяний вирус 40 (SV40) (обезьяна)
- Полиомавирус (Pv) (мышь)
- Вирусы ВК и JC (BKV, JCV) (человек)

Папилломавирусы

- Вирусы папилломы человека (HPV) (по крайней мере 16 типов: от HPV-1 до HPV-16)
- Вирус папилломы Шоупа (грызуны)
- Вирус папилломы крупного рогатого скота (пять типов)
- Вирусы папилломы лошадей, собак, овец, лосей, оленей, мыши *Mastomys natalensis* и ябликов

Аденовирусы

- Аденовирусы человека (Ad) (по крайней мере 37 типов)
 - Группа А (Ad12, 18, 31)
 - Группа В (Ad3, 7, 11, 14, 16, 21)
 - Группа С (Ad1, 2, 5, 6)
 - Группа D (Ad8—10, 13, 15, 17, 19, 20, 22—30)
 - Группа Е (Ad4)

Аденовирусы обезьян (24), крупного рогатого скота (9), мыши (2), собак (2), птиц (8), овец (5), свиней (4), овец, лошадей и тупайи

Герпесвирусы**Подсемейство альфа**

- Вирус простого герпеса типа 1 (HSV-1) (человек)
- Вирус простого герпеса типа 2 (HSV-2) (человек)
- Вирус герпеса лошадей типа 1 (ESV-1)

Подсемейство бета

Цитомегаловирус человека (HCMV)

Подсемейство гамма

- Вирус болезни Марека (MDV) (куры)
- Herpesvirus saimiri* [белыча обезьяна (саймири)]
- Herpesvirus ateles* [паукообразная обезьяна (ателес)]

Неклассифицированные

- Герпесвирус Люкке (лягушки)
- Herpesvirus sylvilagus* (американский жесткошерстный кролик)

Вирусы, подобные вирусу гепатита В

- Вирус гепатита В (HBV) (человек)
- Вирус гепатита североамериканского лесного сурка, *Marmota monax* (WHV)
- Вирус гепатита земляной белки, *Spermophilus beecheyi* (GSHV)
- Вирус гепатита В уток (DHBV) (пекинская утка, *Anas domesticus*)

ловека (HBV), гепатита североамериканского сурка (WHV), гепатита земляных белок (GSHV) и гепатита уток (DHBV).

Хотя адено- и полиомавирусы индуцируют образование опухолей у экспериментальных животных и обладают способностью трансформировать клетки *in vitro*, данные, которыми мы на сегодняшний день располагаем, говорят о том, что эти вирусы никак не связаны с развитием рака у животных и человека. В противоположность этому некоторые папилломавирусы, герпесвирусы и HBV-подобные вирусы имеют отношение к этиологии рака

у животных-хозяев. Более того, существуют данные (правда, не окончательные), что вирусы, принадлежащие к этим семействам, вызывают рак у человека.

Свойства ДНК-содержащих опухолеродных вирусов

Свойства некоторых хорошо изученных опухолеродных ДНК-вирусов описаны в табл. 12.2. Диаметр наружного капсида вирионов варьирует от 40 до 100 нм. Наружная липидная оболоч-

Таблица 12.2. Свойства вирусов — прототипов различных семейств ДНК-содержащих опухолеродных вирусов

	Вирус полио- мы (Рy)	Обезьяний вирус 40 (SV40)	Вирус па- пилломы крупного рогатого скота типа 1 (BPV-1)	Адено- вирус че- ловека типа 2 (Ad2)	Вирус простого герпеса типа 2 (HSV-2)	Вирус гепатита В (HBV)
1. Размер генома, kb	5,3	5,2	7,9	36	144	3,2
2. Диаметр капси- да, нм ¹	45	45	55	80	100 ¹	42
3. Клетка-хозяин						
а. продуктивная инфекция	Мышь	Африкан- ская зеленая мартышка	Нет	Человек	Человек, хомяк, кролик	Нет
б. трансформация	Хо- мяк, крыса	Мышь, человек, хомяк	Мышь	Крыса, хомяк	Хомяк ² , мышь	Нет

¹ Диаметр капсида — это то же самое, что диаметр вириона для всех онкогенных ДНК-вирусов, кроме герпесвирусов.

² HSV-2 летален для клеток большинства млекопитающих. Чтобы выявить трансформирующую способность HSV-2, необходимо подавить его инфекционность.

ка имеется только у герпесвирусов. По размеру генома опухолеродные ДНК-вирусы сильно различаются. Полиома- и папилломавирусы содержат небольшую кольцевую сверхспиральную молекулу ДНК длиной около 5,3 и 7,9 kb соответственно. Размер генома адено- и герпесвирусов гораздо больше. Эти вирусы содержат линейную двухцепочечную ДНК размером 30—38 и 140—240 kb соответственно. Геном HBV-подобных вирусов — самых мелких из опухолеродных ДНК-вирусов — имеет уникальную структуру. Он представлен двухцепочечной молекулой ДНК длиной около 3,2 kb, содержащей одноцепочечный пробел. Кольцевая конфигурация молекулы стабилизируется благодаря спариванию 300 оснований, расположенных на 5'-конце каждой цепи.

Полиома-, адено- и герпесвирусы обладают способностью к двум видам деятельности: а) *продуктивной инфекции* клеток,

пермиссивных для вирусной репликации (обычно клеток природных хозяев: например, клеток мыши в случае Ру или клеток человека в случае Ad), которая сопровождается репликацией вируса и гибелью клетки; б) *трансформации* (с низкой эффективностью) небольшой доли клеток, непермиссивных или полупермиссивных для вирусной репликации (обычно клеток других животных; табл. 12.2). Некоторые герпесвирусы, например HSV-1 и 2, ведут себя нетипично: они вызывают продуктивную инфекцию и гибель клеток большинства млекопитающих; чтобы обнаружить трансформирующую активность этих вирусов, их приходится инактивировать. В клетках, продуктивно инфицированных полиома-, адено- или герпесвирусами, осуществляется экспрессия всего вирусного генома, а в клетках, трансформированных этими вирусами или папилломавирусами, экспрессируется лишь та часть вирусного генома, которая содержит трансформирующие гены. К сожалению, пока не существует культуры клеток, на которой можно было бы изучать процесс продуктивной инфекции, вызванной папилломавирусами. Поэтому мы не располагаем достаточной информацией о жизненном цикле этих интереснейших вирусов. Точно так же отсутствуют культуры, пригодные для изучения продуктивной инфекции клеток HBV-подобными вирусами, и пока не удалось трансформировать культивируемые клетки вирусами этого семейства.

Трансформация клеток

Размер генома опухолеродных ДНК-вирусов сильно варьирует (табл. 12.2), но та часть генома, которая кодирует вирусные трансформирующие гены, невелика. Трансформирующие области геномов полиома-, папиллома- и аденовирусов составляют примерно 3 kb. Адено- и полиомавирусы часто используют в качестве моделей для исследования молекулярной биологии клеточной трансформации, а также организации и экспрессии генов эукариот. За последние семь лет мы узнали много нового о трансформирующих областях Ру, SV40 и аденовирусов групп А, В и С человека. Трансформация осуществляется в результате стабильной интеграции вирусной ДНК в клеточный геном и экспрессии специфических вирусных генов, кодируемых трансформирующей областью. Пока не удалось идентифицировать какие-либо специфические участки интеграции в геноме клетки-хозяина или вирусном геноме. Проведено картирование трансформирующих генов SV40, Ру и Ad, а также идентифицированы и изучены их трансформирующие белки (часто называемые опухолевыми антигенами или Т-антигенами). Перед исследователями стоят сейчас следующие вопросы: какие вирусные белки нужны для трансформации, каковы их биологические функции в процессе

трансформации и что является молекулярной основой их активности? В данной главе изложены сведения о членах каждого семейства опухолеродных ДНК-вирусов.

Полиомавирусы

SV40, Ру, ВКV и JCV трансформируют клетки в культуре и индуцируют опухоли у лабораторных животных, но не вызывают рак у своих природных хозяев. Трансформирующие области SV40 и Ру представляют собой единое семейство перекрывающихся генов Т-антигенов. SV40 кодирует большой и малый Т-антигены мол. массой 94К и 17К соответственно. Экспрессия большого Т-антигена SV40 инициирует трансформацию клетки, а постоянная его экспрессия обеспечивает сохранение у клетки фенотипических признаков трансформированного состояния. Трансформация клеток вирусами SV40, Ру и Ad — это сложный многоступенчатый процесс, включающий по крайней мере два класса кодируемых вирусом функций: а) функцию «стабилизации», или «иммортализации» клеток (превращение клеток в «бессмертные») и б) функцию «трансформации», необходимую для перехода клетки в полностью трансформированное состояние. Чтобы обеспечить неограниченный рост клеток в культуре, достаточно экспрессии N-концевого домена большого Т-антигена, но для индукции всех фенотипических признаков трансформации необходима экспрессия оставшейся части большого Т-антигена SV40. Малый Т-антиген для трансформации клеток не нужен, но при определенных условиях он может играть роль усилителя.

Большой Т-антиген SV40 — полифункциональный белок, участвующий в нескольких биохимических реакциях, в том числе в специфическом связывании с вирусной ДНК, в инициации репликации вирусной ДНК, в регуляции транскрипции ранних и поздних генов, в активации экспрессии некоторых клеточных генов и, вероятно, в инициации репликации клеточной ДНК. Большой Т-антиген обладает АТРазной активностью, а кроме того, связывается с клеточным белком р53 и, по-видимому, с клеточной протеинкиназой. р53 относится к группе клеточных белков, сопутствующих трансформации; очевидно, такие белки играют какую-то роль в клеточном росте. В настоящее время изучается вопрос о том, какие из перечисленных биохимических функций большого Т-антигена существенны для трансформации. Большой Т-антиген присутствует главным образом в ядрах клеток, однако часть популяции этих молекул (или модифицированные молекулы) связывается с плазматической мембраной, что согласуется с представлением о возможной ее роли в процессе трансформации.

Ру кодирует большой, средний и малый Т-антигены с мол. массой 100К, 55К и 22К соответственно. Необходимым и достаточным условием инициации трансформации у линии клеток в культуре (у «бессмертных», неограниченно растущих клеток), а также поддержания этих клеток в трансформированном состоянии является экспрессия среднего Т-антигена. Таким образом, большой Т-антиген Ру для трансформации immortalized линии клеток не нужен. Однако для трансформации первичной культуры фибробластов эмбрионов крыс необходимы и средний Т-антиген, и N-концевая часть большого. При этом N-концевая часть большого Т-антигена Ру сама по себе обладает способностью к immortalization первичных крысиных фибробластов. Время жизни таких фибробластов становится неограниченным, но они не обладают многими фенотипическими признаками, характерными для трансформированных клеток. Последующая трансфекция ДНК, кодирующей лишь средний Т-антиген Ру, в клетки, immortalized большим Т-антигеном Ру, может привести к появлению у этих клеток фенотипа, характерного для полной трансформации. Для согласованной трансформации первичных клеток большим и средним Т-антигенами нужен малый Т-антиген Ру. По-видимому, та клеточная функция, которая активизируется непрерывным пересевом первичных клеток в культуре, может быть заменена функцией, выполняемой малым Т-антигеном Ру в процессе трансформации первичных клеток. Биохимические функции большого Т-антигена Ру аналогичны описанным выше функциям большого Т-антигена SV40. Большие Т-антигены Ру и SV40 накапливаются главным образом в клеточном ядре; это позволяет думать, что immortalization клеток — ядерная функция.

Средний Т-антиген Ру обладает протеинкиназной активностью либо связан с протеинкиназой, которая специфически фосфорилирует гидроксильную группу тирозина. Это интересный факт, поскольку тирозинспецифическая протеинкиназная активность сопутствует процессу трансформации клеток некоторыми онкогенными ретровирусами, а также участвует в регуляции роста клеток белковыми гормонами роста. Согласно последним данным, средний Т-антиген образует стабильный комплекс с $pp60^{c-src}$ — клеточным гомологом протеинкиназы вируса саркомы Рауса $pp60^{src}$, что, очевидно, объясняет ферментативную активность среднего Т-антигена. Средний Т-антиген находится в плазматической мембране или цитоплазматической мембранной фракции трансформированных клеток. По-видимому, для проявления трансформирующей активности средний Т-антиген Ру, а также часть молекул большого Т-антигена SV40 должны взаимодействовать с какой-то мембранной структурой.

Папилломавирусы

Папилломавирусы чрезвычайно интересны как с научной, так и с медицинской точек зрения, поскольку они в отличие от полиома- и аденовирусов причастны к развитию рака у своих природных хозяев. Кроме того, они представляют интерес в том отношении, что состояние дифференцировки хозяйской клетки регулирует их репликацию. К сожалению, модельные системы культур клеток, которые позволяли бы исследовать папилломавирусы, отсутствуют, поэтому о процессе их репликации мы знаем мало. Впрочем, совсем недавно все же были получены важные сведения на этот счет. В настоящее время известно по крайней мере 16 папилломавирусов человека (HPV), причем большинство из них обнаружено за последние 10 лет. Эти вирусы, как следует из последних работ, по-видимому, причастны к развитию рака мочеполовых путей.

Интересно, что геном папилломавируса в трансформированной клетке представлен в виде свободнореплицирующейся молекулы эписомной вирусной ДНК, а не в интегрированном виде, как в случае полиома- и аденовирусов. Это открытие лежит в основе использования ДНК вируса папилломы крупного рогатого скота типа 1 (BPV-1) в качестве вектора для введения в мышинные клетки чужеродных генов посредством ДНК-опосредованной клеточной трансформации. Проведено картирование области генома BPV-1, которая кодирует трансформирующую функцию, но ранние и трансформирующие белки не идентифицированы.

Аденовирусы

Все известные аденовирусы человека (от Ad1 до Ad31) обладают способностью трансформировать клетки грызунов *in vitro*, но лишь для членов групп А, В и D показано, что они индуцируют образование опухолей у лабораторных животных. Как следует из работ по молекулярной гибридизации, ни один из аденовирусов (от А до Е) не причастен к развитию рака у человека. Трансформирующие гены аденовирусов локализованы в левой части молекулы ДНК, в области, составляющей 11% длины вирусного генома. Трансформирующая область включает два семейства перекрывающихся генов — их называют *ранними областями 1А (E1A) и 1В (E1B)*, которые кодируют два семейства Т-антигенов. E1A кодирует два Т-антигена, причем оба являются фосфопротеинами. Эти белки (в случае Ad2) состоят из 289 и 243 аминокислотных остатков, и оба они нужны для полной трансформации клетки. Экспрессия большого Т-антигена E1A активирует экспрессию других ранних вирусных генов. Кроме того, она может также активировать экспрессию одних и подавлять

экспрессию других клеточных генов. В результате экспрессии Е1А появляются частично трансформированные клетки, обладающие неограниченным временем жизни. Таким образом, Т-антигены Е1А Ад выполняют функцию «иммортализации» подобно большим Т-антигенам SV40 и Ру. Сходны эти антигены и в том отношении, что все они накапливаются в ядре.

Область Е1В кодирует три главных Т-антигена с мол. массой 19К, 53К и 20К. Т-антиген 19К не связан с последними двумя Т-антигенами и транслируется при другой рамке считывания. Напротив, Т-антигены Е1В-53К и Е1В-20К тесно связаны друг с другом и транслируются при одной и той же рамке считывания. Т-антиген Е1В-19К локализован в плазматической мембране и ядерных структурах; он необходим для индукции полностью трансформированного состояния. Таким образом, имеются по крайней мере три аденовирусных Т-антигена, которые в процессе трансформации осуществляют различные функции: два главных Т-антигена Е1А и Т-антиген Е1В-19К. При трансформации клеток *in vitro* путем трансфекции с помощью рестрикционных фрагментов вирусной ДНК та область вирусного генома, которая кодирует Т-антиген Е1В-53К, не нужна. Однако имеются данные, что Т-антиген Е1В-53К сообщает трансформированным клеткам какое-то свойство, необходимое для индукции опухоли у голых мышей (линия *nud*). Т-антиген Е1В-53К, по-видимому, присутствует как в ядре, так и в цитоплазме; он тесно связан с протеинкиназной активностью и с клеточным белком р53. Возможная роль Т-антигена Е1В-20К в процессе трансформации пока не ясна.

Герпесвирусы

Трансформировать клетки могут члены всех трех подсемейств — альфа, бета и гамма (табл. 12.1), но лишь гамма-герпесвирусы способны вызвать опухоли у лабораторных животных. Некоторые герпесвирусы вызывают рак у своих природных хозяев, например болезнь Марека у кур и карциному Люкке у лягушек. Высокоонкогенными герпесвирусами приматов являются *H. saimiri* и *H. ateles*; они могут индуцировать образование злокачественных опухолей у некоторых человекообразных приматов, но не у своих природных хозяев — беличьей и паукообразной обезьян.

Имеются убедительные эпидемиологические данные, предполагающие, что герпесвирусы играют роль коканцерогена в развитии рака у человека, в частности EBV причастен к развитию лимфомы Беркита и рака носоглотки. Подтверждением этому служит тот факт, что в тканях этих опухолей всегда находят геномы EBV. Чрезвычайно интересные данные получены в одной

из недавних работ. Оказалось, что в клетках лимфомы Беркита обнаруживается транслокация части хромосомы 8 в одну из трех хромосом, которые несут иммуноглобулиновый локус. При этом ген человека *c-myc*, который является гомологом вирусного онкогена миелоцитоматоза птиц, оказывается локализованным в точке цитогенетического разрыва. Возможно, в многоступенчатом процессе онкогенеза, инициируемом заражением В-лимфоцитов EBV, принимает какое-то участие и активация гена *c-myc*.

Исходя из сероэпидемиологических данных еще в начале 60-х г. можно было уловить связь между венерическим заболеванием, вызываемым вирусом простого герпеса типа 2 (HSV-2), и раком шейки матки. Однако ДНК HSV-2 крайне редко обнаруживали в опухолях шейки матки. Более того, недавние тщательные исследования не подтвердили данных о роли HSV-2 в развитии опухолей шейки матки. И все же нельзя исключить, что какой-то инфекционный агент участвует в этом процессе. Последние работы по патогистологии и молекулярной гибридизации позволили предположить, что к развитию рака шейки матки человека причастны специфические гены папилломавирусов.

Геном герпесвирусов в 30 раз больше генома полиомавирусов и в четыре раза больше, чем аденовирусный геном, поэтому он исследован менее детально, чем у других опухолеродных вирусов с меньшим размером ДНК. За последние семь лет достигнуты значительные успехи в понимании молекулярно-биологических аспектов строения генома и процесса репликации у герпесвирусов, однако все же мы еще очень мало знаем о предполагаемых трансформирующих генах и трансформирующих белках у этих вирусов. Не так давно идентифицированы области генома герпесвирусов, обладающие (как показывает трансфекция культивируемых клеток с помощью рестрикционных фрагментов вирусной ДНК) трансформирующей активностью. В геноме HSV-1 идентифицирован один трансформирующий участок, а в геноме структурно и функционально близкого ему HSV-2 — два. При этом ни один из трансформирующих участков HSV-2 не похож на трансформирующий участок HSV-1. Линии клеток, трансформированные с помощью HSV-2, часто теряют специфические фрагменты вирусной ДНК, хотя и сохраняют фенотипические признаки трансформированных клеток. Отсутствие в трансформированных клетках вирусной ДНК привело к предположению о том, что у HSV-2 механизм трансформации клеток радикально отличается от такового у опухолеродных вирусов, содержащих ДНК меньшего размера. «Порази-и-беги» — такое название получил этот механизм, при котором после инициации клеточной трансформации генетический материал вируса уже не нужен. Следует заметить, однако, что клетки, трансформированные с помощью герпесвируса лошадей типа 1 (EHV-1), сохраняют специ-

фическую область вирусного генома; это согласуется с предположением о том, что ENV-1 кодирует некую специфическую функцию, необходимую для трансформации. Недавно получены данные, показывающие, что два рестрикционных фрагмента ДНК из разных областей генома цитомегаловируса человека (HCMV) трансформируют клетки хомячка и крысы. Один из них гомологичен одному из трансформирующих фрагментов HSV-2. Однако данные о том, что трансформированные с помощью HCMV клетки сохраняют вирусную ДНК, пока отсутствуют.

HBV-подобные вирусы

Из-за отсутствия пригодной для экспериментальных исследований культуры клеток HBV-подобные вирусы, как и папиллома-вирусы, изучены мало. Вирус гепатита В человека, обнаруженный в 1966 г., вызывает одно из самых серьезных заболеваний у человека. Исходя из сероэпидемиологических данных, согласующихся с результатами молекулярно-биологических исследований, можно заключить, что устойчивая хроническая инфекция HBV — это главная причина первичного гепатоцеллюлярного рака. Установлено, что носителями HBV являются примерно 200 млн. человек, а первичный гепатоцеллюлярный рак широко распространен во многих странах.

За последние несколько лет открыто три новых HBV-подобных вируса: вирусы гепатита В уток (DHBV), североамериканского сурка (WHV) и земляных белок (GSHV). Эти вирусы по своим размерам и организации, а также по размерам и организации их геномов очень похожи на HBV. HBV, WHV, DHBV и GSHV вызывают у своих природных хозяев болезнь печени и, возможно, первичный гепатоцеллюлярный рак. Репликация HBV-подобных вирусов в зараженных клетках, по-видимому, отличается от репликации других опухолеродных ДНК-вирусов, поскольку включает обратную транскрипцию вирус-специфической РНК. Показано, что при взаимодействии HBV и WHV с клеткой происходит включение вирусного генома в геном хозяина. Экспериментальные доказательства того, что HBV-подобные вирусы обладают онкогенными свойствами, отсутствуют, поскольку не было показано, что эти вирусы трансформируют клетки в культуре или индуцируют опухоли у лабораторных животных. Однако имеется множество эпидемиологических данных о том, что эти вирусы причастны к этиологии гепатоцеллюлярного рака. Кроме того, возможно, у HBV-подобных вирусов механизм индукции рака иной, чем у других вирусов.

Сходные функции трансформирующих генов опухолеродных ДНК-вирусов, онкогенов ретровирусов и онкогенов раковых клеток

Работы последних лет убедительно показали, что трансформация, индуцируемая трансформирующими генами опухолеродных вирусов, онкогенами ретровирусов и клеточными онкогенами клонов раковых клеток человека, представляет собой многоступенчатый процесс, включающий как минимум два или три этапа, т. е. два или три класса биологических функций. Первый класс — «иммортализация» первичных клеток в культуре — нужен для того, чтобы создать линии клеток с неограниченным временем жизни. Функция иммортализации кодируется генами, детерминируемыми N-концевую часть большого Т-антигена Р_у и SV40, генами Е1А аденовирусов и онкогеном *тус*. Вирусный онкоген *тус* содержится в различных опухолях, индуцируемых ретровирусами, которые и осуществляют трансдукцию этого гена. Более того, совсем недавно получены данные о том, что в клетках некоторых опухолей человека усиливается экспрессия клеточного гомолога онкогена *тус* и происходит его перестройка. Продукты, кодируемые ответственными за функцию «иммортализации» генами, обычно представляют собой ДНК-связывающие белки, локализованные в клеточном ядре.

Второй класс функций, которые называют «трансформирующими», необходим для проявления полного набора фенотипических признаков, связанных с онкогенной трансформацией клеток. Это, например, изменение морфологии клетки, размножение в среде, обедненной сывороточными факторами роста, деление без прикрепления к субстрату и способность вызывать развитие опухолей. Этот класс функций закодирован в гене, детерминирующем средний Т-антиген Р_у, в трансформирующей области Е1В аденовирусов и в семействе онкогенов *ras*. Вирусные онкогены *ras* трансдуцируются вирусами мышиной саркомы Кирстена и Харви. Что же касается клеточных гомологов онкогенов *ras*, то они, как выяснилось, оказываются модифицированными при раке мочевого пузыря, раке легких и раке поджелудочной железы. Трансформирующие белки, выполняющие эту вторую функцию, обычно локализованы в клеточной мембране.

Трансфекция с помощью фрагментов ДНК, кодирующих трансформацию, не приводит к трансформации первичных клеток, но в большинстве случаев трансформирует стабильные клеточные линии, иммортализованные либо в результате спонтанной мутации, либо под действием какого-либо химического канцерогена, либо после введения вирусных или клеточных генов, кодирующих функцию иммортализации. Первичные клетки удается трансформировать одновременным введением (котрансфекцией)

фрагментов ДНК, кодирующих функцию трансформации (онкоген *ras* и средний Т-антиген Ру), и фрагментов ДНК, кодирующих функцию иммортализации (аденовирусный Е1А, большой Т-антиген Ру и онкоген *myc*). Имеются сведения, что процесс онкогенной трансформации включает еще один, третий этап, который либо определяется спонтанными клеточными изменениями, либо кодируется трансформирующими генами некоторых опухолеродных ДНК-вирусов. Наконец, получены данные, позволяющие предположить, что трансформация клеток под действием опухолеродных ДНК-содержащих вирусов, ретровирусов и химических канцерогенов активирует экспрессию ряда клеточных генов. Установить функцию этих генов, по-видимому играющих главную роль в регуляции деления клеток, — основная задача будущих работ по опухолеродным вирусам.

Природный и экспериментальный онкогенез и трансформация клетки опухолеродными ДНК-вирусами

Общие свойства трансформированных клеток

Вирус относят к числу опухолеродных, если он способен индуцировать опухоли у лабораторных животных или трансформировать клетки в культуре [92]. Некоторые опухолеродные ДНК-содержащие вирусы вызывают рак и у своих природных хозяев, но для большинства вирусов это не характерно. Обычно для индукции опухолей в лабораторных условиях необходимо ввести в организм соответствующего животного большое количество вируса (как правило, такими животными служат новорожденные грызуны). Трансформация клетки опухолеродными ДНК-содержащими вирусами *in vitro* (в культуре) — также процесс весьма малоэффективный: в случае HSV-2 в результате вирусной инфекции трансформируется лишь одна из 10^6 клеток, а в случае SV40 — максимум одна из 10^2 .

Трансформация клеток под действием опухолеродных ДНК-вирусов *in vitro* используется как модель для изучения биологии и молекулярной биологии самого процесса клеточной трансформации уже около 25 лет. Главная цель этих работ состоит в том, чтобы установить механизм, с помощью которого экспрессия небольшого количества вирусного генетического материала изменяет процесс регуляции роста нормальной клетки до такой степени, что клетка становится трансформированной. При этом исследователи исходят из предположения, что трансформация клеток *in vitro* опухолеродными ДНК-вирусами аналогична процессу образования опухолей в естественных условиях. Отметим, что сравнение свойств клеток, трансформированных *in vitro* опухолеродными ДНК-вирусами, и клеток, взятых из искусственно

индуцированных или естественных опухолей, вообще говоря, подтверждает это предположение. Особенно важный в данном отношении результат — это выявление мутантных и транслоцированных гомологов трансформирующих генов ретровирусов (онкогенов) в раковых клетках человека и обнаружение того факта, что трансформирующие гены опухолеродных ДНК-вирусов, онкогены ретровирусов и раковые клетки человека ответственны за одни и те же биологические функции.

Общепринятого набора характеристик, по которым можно различать трансформированные и нетрансформированные клетки, пока не существует. Главная трудность здесь состоит в том, чтобы определить, что же такое «нормальный клеточный рост». На практике *трансформированной* называют такую клетку, которая приобрела устойчивые ростовые свойства, не характерные для родительской клетки. Часто свойства трансформированной клетки зависят от процедуры отбора, вида хозяина и типа клетки, используемой в эксперименте по трансформации, т. е. от того, первичная это культура клеток или иммортализованная, перmissive или полуперmissive. Для отбора клеток, трансформированных опухолеродными ДНК-вирусами, применяют четыре метода (детальное описание приведено в [286]). 1. Монослойную культуру клеток заражают вирусом и затем пересевают их при невысокой плотности на стеклянную или пластиковую поверхность; трансформированные клетки образуют колонии, которые по плотности и морфологии отличаются от нетрансформированных. 2. Культуру зараженных клеток помещают при низкой плотности в обедненную сывороточными факторами роста среду, которая поддерживает деление только трансформированных клеток. 3. Монослойную культуру заражают и инкубируют от 2 до 5 недель без пересева; клоны трансформированных клеток выглядят как плотные колонии клеток, вырастающие из монослоя; это называют очаговой трансформацией. 4. Клетки заражают в суспензии и высевают в среду, содержащую 0,33% агара или 1,2% метилцеллюлозы; трансформированные клетки в этих условиях образуют большие колонии, а нетрансформированные не растут. В случаях 1 и 3 отбор осуществляется по ростовым свойствам, в случае 2 — по специфическому делению в среде, обедненной сывороткой, в случае 4 — по способности делиться, не прикрепляясь к твердой подложке. Рост в суспензии, по-видимому, коррелирует со способностью трансформированных клеток вызывать образование опухолей. Если в качестве объекта трансформации использовать первичные эмбриональные клетки, то, непрерывно пересевая их, можно осуществлять отбор по признаку иммортализации клеток, переживших кризис старения первичных клеток.

Клетки, трансформированные опухолеродными ДНК-вируса-

ми, приобретают ряд новых свойств. Различия между трансформированными и нетрансформированными клетками можно отнести к трем взаимосвязанным категориям [285]. Это 1) модификации в характере роста, 2) изменения клеточной поверхности и 3) модификация внутриклеточных компонентов, обусловленная присутствием в клетке вирусного генома. Модификации роста клеток включают: а) размножение в культуре до более высокой плотности; б) потребность в меньшем количестве сыворотки; в) способность к размножению без прикрепления к подложке; г) менее ориентированный рост; д) образование колоний при посеве на монослой нормальных клеток; е) образование опухолей при введении лабораторным животным. В изменения клеточной поверхности входят: а) повышенная способность к агглютинации в присутствии растительных лектинов; б) модифицированный состав гликопротеинов и гликолипидов; в) большая скорость переноса некоторых питательных веществ; г) повышенная секреция протеаз или их активаторов. Наконец, изменения внутриклеточных компонентов заключаются в: а) модификации клеточного цитоскелета; б) изменении содержания некоторых циклических нуклеотидов; в) активации или репрессии специфических клеточных генов; г) присутствии в клетке вирусных ДНК, мРНК и белков. У разных линий трансформированных клеток эти свойства могут проявляться в разной степени, причем не обязательно все сразу.

Полиомавирусы

Полиомавирусы животных

SV40 в большом количестве находят в почках макаков-резусов, Ру — у лабораторных мышей. Однако ни Ру, ни SV40 не имеют никакого отношения к развитию рака у своих природных хозяев. Тем не менее они могут индуцировать опухоли у новорожденных грызунов и легко трансформируют клетки *in vitro*. Показано, что Ру индуцирует опухоли различных органов при введении его новорожденным хомячкам, мышам, крысам и кроликам и трансформирует культивируемые клетки мыши, хомячка, крысы и крупного рогатого скота. SV40 индуцирует опухоли у новорожденных хомячков и трансформирует культивируемые клетки хомячка, крысы, обезьяны, крупного рогатого скота, свиньи и человека. Опухолевые клетки в культуре могут быть иммортализованы, а линии, полученные из трансформированных *in vitro* клеток, могут вызывать образование опухолей при введении экспериментальным животным. Исторически сложилось так, что Ру стал первым ДНК-содержащим вирусом, у которого была обнаружена способность к трансформации клеток в культуре. Клетки стано-

вились иммортализованными, делились с повышенной скоростью и вызывали образование опухолей [295]. Это открытие послужило стимулом к исследованию трансформации клеток под действием вирусов на молекулярном уровне.

ДНК вирусов Ру и SV40, а также рестрикционные фрагменты, кодирующие все ранние гены или их участки, ответственные за трансформацию, обладают способностью трансформировать клетки *in vitro* и индуцировать опухоли у новорожденных грызунов [36, 38, 40, 91, 115, 206]. Эти данные прямо указывают на то, что трансформирующие гены локализованы в ранней области вирусного генома (см. разд. «Молекулярная биология трансформации клеток»).

Полиомавирусы человека

Заражение вирусами ВКВ и JCV происходит в раннем детстве. Эти вирусы чрезвычайно широко распространены среди населения Земли. ВКВ был выделен из мочи людей с подавленной иммунореактивностью, но без явных признаков какого бы то ни было заболевания. JCV вызывает прогрессирующую очаговую лейкоэнцефалопатию (ПОЛ), сравнительно редкое демиелинизирующее заболевание с летальным исходом, которое развивается обычно на фоне подавленной иммунореактивности. JCV воспроизводимо выделяют из ткани головного мозга пациентов, больных ПОЛ.

В эксперименте ВКВ индуцирует опухоли у новорожденных хомячков и мышей. JCV высокоонкогенен по отношению к новорожденным хомячкам, индуцирует широкий спектр опухолей и тяготеет к нейроэктодермальным клеткам. Интересно, что JCV может индуцировать опухоли головного мозга у обезьян дурукули при введении его взрослым животным. ВКВ трансформирует клетки различных животных, в том числе хомячка, крысы, мыши, кролика и африканской зеленой мартышки. ДНК ВКВ трансформирует клетки крысы и хомячка, а ДНК JCV — первичные культуры глиальных клеток новорожденных хомячков, причем трансформированные клетки становятся причиной опухолей у хомячков-сосунков.

Хотя и ВКВ, и JCV чрезвычайно широко распространены и высокоонкогенны, они, очевидно, не имеют отношения к этиологии рака человека. Обширные данные по молекулярной гибридизации однозначно свидетельствуют об отсутствии ДНК ВКВ и JCV в раковых клетках человека (по результатам обследований примерно 90% раковых больных в США) ([300]; M. Green, неопубликованные данные).

Папилломавирусы

Общие свойства

Папилломавирусы очень интересны с научной и медицинской точек зрения, поскольку по некоторым своим свойствам они отличаются от обычных опухолеродных ДНК-вирусов. Папилломавирусы вызывают у своих природных хозяев образование доброкачественных опухолей, а у нескольких видов животных (возможно, и у человека; см. далее) — злокачественных. Чрезвычайно интересно, что кольцевая вирусная ДНК присутствует в клетках, трансформированных папилломавирусами, в виде эписомы. Это первая особенность, отличающая папилломавирусы от других опухолеродных вирусов, которые, как известно, встраивают свой геном в хромосомную ДНК трансформированной клетки (возможное исключение в этом смысле составляют лишь некоторые герпесвирусы). Другое интересное свойство папилломавирусов заключается в том, что состояние дифференцировки клетки-хозяина регулирует экспрессию вирусного генома. Таким образом, можно надеяться, что, исследуя взаимодействия между вирусом и клеткой, мы поймем механизм клеточной дифференцировки.

Бородавки, или папилломы, вызываемые папилломавирусами, известны очень давно. Эти новообразования представляют собой доброкачественные опухоли, которые обычно не дают метастазов и не приводят к гибели организма-хозяина, но очень заразны и широко распространены у многих животных. В конце XIX — начале XX столетия был осуществлен эксперимент по переносу папиллом от человека к человеку и от животного к животному.

О репликации папилломавирусов и об индуцируемой ими трансформации клеток известно очень мало. Считается, что вирус заражает базальные клетки эпидермиса, трансформирует их, клетки начинают делиться, и в результате образуется папиллома. В этих пролиферирующих клетках вирусные частицы либо не образуются совсем, либо образуются в небольших количествах. Вирус интенсивно размножается в кератинизирующихся клетках, поскольку по мере их оттеснения к наружному слою ткани они перестают делиться и, по-видимому, становятся более перmissивными.

Недавно проведены опыты по клонированию геномов папилломавирусов. Определение их нуклеотидной последовательности позволило получить представление о генетической организации папилломавирусов, а использование их ДНК в качестве зонда — провести транскрипционный анализ. Выделено много новых видов HPV и получены данные о том, что некоторые из них, по-видимому, играют роль в развитии рака у человека.

Таблица 12.3. Папилломавирусы животных ¹

Папилломавирус	Поражаемый орган (ткань)	Гистология	Индукция ра- ка у природ- ных хозяев	Индукция ра- ка у хомьяч- ков
А. Охарактеризованные папилломавирусы				
Вирусы папилломы крупно- го рогатого скота				
BPV-1	Соски и вымя	Фибропапилло- ма	—	Да
BPV-2	Кожа	»	—	»
BPV-3	»	Папиллома	—	—
BPV-4	Пищеваритель- ный тракт	»	Да	—
BPV-5	Соски и вымя	Фибропапилло- ма	—	—
BPV-6	То же	Папиллома	—	—
Вирус папилломы кролика <i>Sylvilagus</i> (CRPV)	Кожа	»	Да	—
Вирус папилломы лошадей	Кожа	»	—	—
Вирус папилломы полости рта собак	Слизистая рта	»	—	—
Вирус папилломы овец	Кожа	Фибропапилло- ма	—	Да
Вирус папилломы лосей	»	»	—	»
Вирус фибромы оленей	»	Фиброма	—	»
Вирус папилломы северного оленья	»	Фибропапилло- ма	—	—
Вирус папилломы <i>Mastomys natalensis</i>	»	Папиллома	Да	—
Вирус папилломы зябликов	»	»	—	—
Б. Неохарактеризованные папилломавирусы				
Оппосума	Кожа	Папиллома		
Собак	»	»		
Свиней	»	»		
Койотов	Слизистая рта	»		
Кроликов	То же	»		
Коз	Вымя	»		

¹ Из [160] с изменениями.**Папилломавирусы животных**

Папилломавирусам животных посвящен детальный обзор Ланкастера и Олсона [160]. В табл. 12.3 перечислены 15 папилломавирусов, описанных в этом обзоре, а также шесть вирусов, впоследствии описанных в литературе. Папилломавирусы животных индуцируют опухоли трех видов: а) папилломы — доброка-

чественные опухоли эпителия; б) фибропапилломы, затрагивающие не только эпителий, но и фиброзную соединительную ткань; в) фибромы, которые состоят главным образом из фиброзной соединительной ткани, содержащей пролиферирующие фибробласты. Три папилломавируса животных вызывают рак у своих природных хозяев: вирус папилломы крупного рогатого скота типа 4 (BPV-4), который индуцирует рак пищеварительного тракта и мочевого пузыря у крупного рогатого скота, но только у тех особей, которые питаются папоротником [136]; вирус папилломы американских кроликов *Sylvilagus* (CRPV), который в естественных условиях вызывает рак у диких американских кроликов [146]; МнРV — вирус папилломы мыши *Mastomys natalensis* [195]. Показано, что пять вирусов папилломы — BPV-1, BPV-2, вирусы папилломы овец и лося и фибромы оленей — при инъекции вызывают опухоли у хомячков.

CRPV представляет собой прекрасную модель для изучения вирусного канцерогенеза и перерождения незлокачественной папилломы в карциному. CRPV вызывает энзоотическое заболевание у диких американских кроликов на плоскогорьях Среднего Запада США. Чаще всего эти опухоли претерпевают обратное развитие, но в 25% случаев перерождаются в карциномы. Домашних кроликов в эксперименте также удается заразить CRPV; при этом образуются папилломы кожи, 75% которых перерождаются в карциномы. Папилломы, перерождающиеся в карциномы, индуцируются у домашних кроликов и под действием ДНК CRPV [131].

Папилломавирусы крупного рогатого скота (BPV) заражают различные ткани у этих животных. Шесть вирусов (от BPV-1 до BPV-6) образуют две группы. В первую группу входят BPV 1, 2 и 5, которые индуцируют фибропапилломы и, как показывают эксперименты по гибридизации, содержат ДНК с близкой нуклеотидной последовательностью. Вторая группа включает BPV 3, 4 и 6; они индуцируют папилломы, и их ДНК также имеют близкие последовательности. Сходство между ДНК вирусов первой и второй групп незначительно.

BPV-1 и BPV-2 индуцируют опухоли при введении их телятам, мышам, кроликам, птицам и хомячкам. У лошадей они вызывают фибросаркомы, причем, по-видимому, также и в естественных условиях, в основном вследствие межвидового заражения [161]. *In vitro* вирусные частицы BPV-1 и BPV-2 и вирусная ДНК трансформируют клетки эмбрионов крупного рогатого скота, хомячков и мышей [14, 15].

BPV-4 интересен как модельная система для изучения многофакторного канцерогенеза с участием вирусного и химического канцерогенов. Этот вирус вызывает широко распространенные папилломы пищеварительного тракта крупного рогатого скота,

которые встречаются примерно у 20% животных Англии. У значительной части животных эти папилломы перерождаются в злокачественные опухоли, но наблюдается это только в северной части Шотландии и Северной Англии, где скот питается папоротником, содержащим канцероген [136]. Последовательности ДНК BPV-4 обнаружены также в тканях злокачественных опухолей. Полагают, что BPV-4 индуцирует у крупного рогатого скота опухоли мочевого пузыря, которыми страдает 30% животных названных областей. Информация о BPV-3, 5 и 6 весьма скудна.

Эндогенные папилломавирусы грызуна *Mastomys natalensis* находят в виде эписом в тканях эмбриона. Чем старше животное, тем большее число копий вирусной ДНК обнаруживается в коже. Одновременно с этим при старении наблюдается значительное увеличение распространенности кожных опухолей; возможно, это связано именно с высоким содержанием ДНК МпРВ в эпидермисе.

Папилломавирусы человека

В табл. 12.4 перечислены 16 типов папилломавирусов человека, причем большинство из них обнаружено за последние пять лет. Выделенный вирус считается новым типом HPV, если степень его гомологии с известными типами HPV не превышает 50% по данным «жесткой» (ДНК—ДНК)-гибридизации [39].

Разные типы HPV индуцируют развитие различных папилломоподобных образований. HPV-1 и 4 вызывают подошвенные бородавки (или подошвенные папилломы), HPV-2 — бородавки на руках [39], HPV-7 — так называемые папилломы мясников [210], HPV-6 и 11 — остроконечные кондиломы (переносимые половым путем генитальные бородавки) и папилломы гортани [86, 87, 155, 208], HPV-13 вызывает очаговую гиперплазию полости рта [220], а HPV-3, 5, 8, 9, 10, 12 и 14 — плоские бородавки и бородавчатую эпидермодисплазию [153, 154, 209, 219]. Недавно открытый папилломавирус HPV-16 был обнаружен в опухолях шейки матки [60]. На Рабочем совещании ЕМВО по папилломавирусам в Оренае (Швеция, 27—30 июля 1983 г.) докладывалось об открытии еще девяти HPV.

Бородавчатая эпидермодисплазия (БЭ) — сравнительно редкое заболевание с длительным течением, сопровождающееся диссеминацией папиллом. С БЭ связывают по крайней мере восемь разных видов HPV. От больных БЭ часто выделяют сразу несколько видов HPV, но о механизме, приводящем к длительному заражению этих пациентов HPV, ничего не известно. Чрезвычайно интересно, что у $\frac{1}{3}$ больных БЭ развивается болезнь Боуэна, или плоскоклеточный рак. Развитие рака связывают с HPV трех видов: прежде всего с HPV-5, а также с HPV-8 и 10. И действи-

Таблица 12.4. Папилломавирусы человека

Вирус	Патология
HPV-1	Verruca vulgaris (подошвенные бородавки)
HPV-2	Verruca vulgaris (обычные бородавки на руках)
HPV-3	Verruca planta (плоские бородавки); бородавчатая эпидермодисплазия
HPV-4	Verruca vulgaris (подошвенные бородавки)
HPV-5	Verruca planta (плоские бородавки); бородавчатая эпидермодисплазия (перерождающаяся в злокачественную)
HPV-6	Condyloma acuminata (генитальные бородавки); рак шейки матки
HPV-7	Папилломы мясников
HPV-8	Бородавчатая эпидермодисплазия (перерождающаяся в злокачественную)
HPV-9	Verruca planta (плоские бородавки); бородавчатая эпидермодисплазия (перерождающаяся в злокачественную)
HPV-10	Verruca planta (плоские бородавки); бородавчатая эпидермодисплазия (перерождающаяся в злокачественную); рак шейки матки; рак наружных женских половых органов
HPV-11	Папилломы гортани и кондиломы; рак шейки матки
HPV-12	Бородавчатая эпидермодисплазия
HPV-13	Очаговая гиперплазия полости рта
HPV-14	Бородавчатая эпидермодисплазия
HPV-15	То же
HPV-16	Рак шейки матки; папулозность типа болезни Боуэна

тельно, HPV-5 был выделен из плоскоклеточных раковых опухолей нескольких больных [209, 211]. Интересно, что HPV, родственные HPV-6, 10, 11 и 16, обнаружены в раковых опухолях мочеполювых путей у пациентов, не больных БЭ. Эти виды HPV описаны более полно в следующем разделе.

Папилломавирусы человека и рак

О возможной роли HPV в развитии рака у человека говорит очень много данных [104, 209, 309]. Во-первых, HPV чрезвычайно широко распространены и эпителиотропны. Это важное обстоятельство, поскольку известно, что большинство раковых опухолей человека являются карцинами, т. е. представляют собой злокачественные новообразования, состоящие из эпителиальных клеток. Во-вторых, HPV — единственная группа вирусов, для которой доказано, что они индуцируют образование опухолей у человека в естественных условиях (папилломы или бородавки), и получено множество данных о перерождении папиллом в карци-

номы. В-третьих, папилломавирусы являются агентами, вызывающими рак у животных в естественных условиях, и по аналогии можно предположить, что сходную роль они играют также в развитии рака у человека.

Анализ различных видов тканей человека на присутствие в них специфических последовательностей ДНК HPV проведен в нескольких работах. В одной из ранних работ, где в качестве зонда для гибридизации использовалась ^3H -меченная комплементарная РНК (полученная путем транскрипции нетипированной ДНК HPV, выделенной из подошвенной бородавки), в карциноме шейки матки, лимфоме Ходжкина и саркоме Капоши вирусную ДНК обнаружить не удалось [311]. Грин и др. [105] пытались обнаружить ДНК HPV-1 и 2 в 150 опухолях человека с помощью молекулярной гибридизации в растворе, используя в качестве зонда ^{32}P -ДНК. При чувствительности 0,1 копии вирусной ДНК на клетку ДНК этих вирусов не была обнаружена. Проанализированные виды рака составляют примерно 50% случаев раковых заболеваний в США. Таким образом, этот результат является убедительным доказательством того, что ни HPV-1, ни HPV-2 не вызывают ни одну из исследованных форм рака. Однако не исключено, что в этиологии рака человека участвуют другие виды HPV, поскольку методом молекулярной гибридизации с использованием ДНК HPV-1 и 2 не удается обнаружить в тканях человека единичные копии генов других, не родственных им HPV.

Позже Грин и др. [104] осуществили клонирование HPV, изначально названного HPV-БЭ, но, возможно, идентичного недавно открытому HPV-10 [154]. Этот вирус был выделен из пораженных участков кожи рук и ног больных бородавчатой эпидермодисплазией. ДНК HPV-БЭ была выявлена методом блот-гибридизации в карциноме *in situ* женских наружных половых органов, развившейся у пациентки, от которой был выделен вирус. Геномы родственных HPV были обнаружены еще у четырех больных в злокачественных опухолях мочеполовых путей. Опухоли, для которых был получен положительный результат в экспериментах по «жесткой» гибридизации с использованием ДНК HPV-БЭ в качестве зонда, включали две из 31 опухоли шейки матки и две из 10 опухолей женских наружных половых органов и содержали в основном свободные эписомные молекулы ДНК HPV [104]. Клетки, трансформированные папилломавирусами животных, также поддерживаются в трансформированном состоянии эписомной формой вирусного генома. Эти данные согласуются с представлением о том, что HPV играют роль в развитии рака мочеполовых путей человека, хотя и не служат четким доказательством.

Сообщения о том, что ДНК HPV присутствует в раковых опухолях мочеполовых путей [104], подтверждаются аналогичными данными, полученными в двух других лабораториях. Применяв метод «жесткой» гибридизации, Захоу и др. [306] обнаружили геномы вирусов, родственных HPV-6, в двух бородавчатых карциномах и одной карциноме *in situ* женских наружных половых органов, а в случае мягкой гибридизации — ДНК, родственную HPV-БЭ (HPV-10), еще в одной бородавчатой и трех карциномах *in situ* женских наружных половых органов. В работе [88] сообщается о присутствии ДНК HPV-11 и HPV-6 в трех (из 24) злокачественных опухолях шейки матки — одной инвазивной и в двух карциномах *in situ*. Дюрст и др. [60] осуществили клонирование нового папилломавируса, HPV-16, из опухоли шейки матки и использовали этот клон в качестве зонда для анализа рака мочеполовых путей. В 35—50% опухолей шейки матки, обнаруженных у больных из разных стран, и у 25% обследованных пациентов, больных раком наружных половых органов, была найдена ДНК, родственная ДНК HPV-16. Эти впечатляющие результаты являются веским доводом в пользу представления об участии некоторых HPV в этиологии рака мочеполовых путей.

Роль HPV в развитии рака мочеполовых путей подтверждается также результатами клинических, гистологических, иммунологических и эпидемиологических исследований, проведенных в разных странах. Рак мочеполовых путей человека обнаруживает эпидемиологическое поведение, характерное для венерических заболеваний [309]. Остроконечная кондилома (генитальные бородавки) передается половым путем и, как полагают, вызывается главным образом HPV-6 и 11. В США и некоторых других странах это заболевание иногда принимает характер эпидемии. Последние статистические данные Центра по инфекционным заболеваниям в Атланте (шт. Джорджия) показывают, что в США кондиломы встречаются не реже, чем гонорея, и в три раза чаще, чем переносимая половым путем болезнь, вызываемая HPV-2. Множество клинических отчетов, написанных за последние десятилетия, свидетельствует о возможности перерождения кондилом в злокачественные опухоли. Например, кондиломы женских наружных половых органов ответственны за 5% карцином этих органов [290]. Плоскоклеточные папилломы шейки матки тоже иногда перерождаются в карциномы [145]. Высказывалось предположение (см. [1]), что в карциномы могут перерождаться и кондиломы прямой кишки.

Недавно обнаружено новое кондиломоподобное заболевание, при котором образуются очень мелкие, невидимые невооруженным глазом плоские бородавки; его часто называют субклинической папилломавирусной инфекцией (СПИ). СПИ связывают

с цервикальной эпителиальной дисплазией и неоплазией [133, 167, 188, 189, 224, 230, 277]. Считается, что в большинстве случаев передача HPV половым путем ведет к субклинической инфекции и только в редких случаях сопровождается образованием кондилом. Недавно получены гистологические данные о наличии СПИ у 91% женщин, оперированных по поводу инвазивной или преинвазивной неоплазии; в контрольной группе эта цифра составляет 13% [231]. Конечно, с помощью одних только гистологических тестов нельзя доказать участия HPV в развитии этих заболеваний, но последние работы с использованием иммунопероксидазного окрашивания антисывороткой против группоспецифического антигена, присущего семейству папилломавирусов [137], подтвердили, что генетический материал HPV содержится в ткани при дисплазии шейки матки [157, 301]. Результаты этих клинических исследований и обнаружение с помощью молекулярной гибридизации HPV-геномов в раковых опухолях мочеполовых путей подтверждают представление о том, что заражение HPV, возможно, является важным фактором в перерождении, проходящем через стадию койлоцитотической атипии с цервикальной дисплазией в инвазивную карциному.

Возможно, HPV принимает участие в образовании злокачественных опухолей не только мочеполовых путей и прямой кишки, но и других форм рака. Сообщалось, что плоскоклеточные карциномы гортани, пищевода и языка гистологически очень близки поражениям, характерным для дисплазии шейки матки, связанной с HPV [278—281]. Более того, из тканей этих потенциальных мишеней недавно было выделено два новых вида HPV — HPV-11 из папиллом гортани [87] и HPV-13 из очаговой гиперплазии полости рта [220]. Было показано, что ДНК HPV присутствует не только в папилломах гортани, но и в окружающей их нормальной ткани пациентов в стадии ремиссии [272]. Папилломатоз гортани представляет собой серьезную клиническую проблему, поскольку он плохо поддается лечению, а вирус легко проникает в прилежащие ткани. Возможно, скрытое заражение HPV слизистой гортани, полости рта, пищевода и дыхательных путей играет роль коканцерогена в этиологии некоторых видов рака указанных органов. Об этом же свидетельствует индукция рака пищеварительного тракта у крупного рогатого скота при совместном действии ВПЧ-4 и канцерогена, присутствующего в папоротнике [136]. Вполне возможно, например, что субклинические поражения, индуцируемые скрытым заражением неизвестным HPV дыхательных путей, могут перерождаться в карциномы при длительном воздействии канцерогена, присутствующего в табачном дыме.

Аденовирусы

Аденовирусы человека

Ad12 и Ad18 — это первые вирусы человека, для которых была четко доказана онкогенность. В 1962 г. было показано, что они индуцируют опухоли у новорожденных грызунов [124, 289]. Вирусы Ad1 — Ad31 образуют пять групп — от А до Е, сформированных по признаку гомологии геномов [99, 221] (табл. 12.5).

Таблица 12.5. Свойства аденовирусов человека групп А — Е

Группа	Тип	Гомология ДНК [99]	Способность вызывать опухоли у новорожденных хэмьячков	Трансформация клеток	Гомология трансформирующей области [180]
А	12, 18, 31	48—69% в пределах группы, 8—20% с другими типами	Высокая: опухоли у большинства животных образуются через 4 месяца	+	35—71% в пределах группы, 2—7% с другими типами
В	3, 7, 11, 14, 16, 21	89—94% в пределах группы, 9—20% с другими типами	Низкая: через 4—18 месяцев образуются опухоли у незначительной части животных	+	85—99% в пределах группы, 2—12% с другими типами
С	1, 2, 5, 6	99—100% в пределах группы, 10—16% с другими типами	Отсутствует	+	98—100% в пределах группы, 1—15% с другими типами
Д	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22—30	95—99% в пределах группы, 4—17% с другими типами	Ad9 индуцирует фиброаденомы молочных желез у крыс	+	Не проверялась
Е	4	4—23% с другими типами	Отсутствует	+	Не проверялась

Группа А состоит из Ad12, 18 и 31, группа В — из Ad3, 7, 11, 14, 16 и 21, группа С — из Ad1, 2, 5 и 6, группа D — из Ad8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20 и 22—30 и группа Е представлена вирусом Ad4. Разбиение аденовирусов на группы в соответствии со степенью гомологии их ДНК в целом совпадает с другими способами формирования групп, основанными на степени онкогенности, взаимосвязи Т-антигенов, GC-содержании, молекулярных свойствах субвирусных частиц и белков вириона и на данных по эпидемиологии и патогенности [99]. Есть указания на то, что кроме

групп А — Е существует еще несколько групп аденовирусов, которые называют кишечными. Их часто обнаруживают при электроно-микроскопическом обследовании фекальных экстрактов младенцев, страдающих тяжелыми гастроэнтеритами небактериального происхождения. Они не растут в обычных клеточных культурах и, по-видимому, не родственны ни одному из ранее типированных аденовирусов человека [79, 232].

Все исследованные на сегодняшний день аденовирусы человека обладают способностью трансформировать фибробласты грызунов *in vitro*. Однако по способности индуцировать у новорожденных грызунов опухоли они различаются (табл. 12.5). Вирусы группы А за четыре месяца индуцируют опухоли у большинства зараженных животных, а аденовирусы группы В (за исключением Ad11) за 4—18 месяцев индуцируют опухоли лишь у небольшой их части [93]. Что же касается групп С, D и Е, то они вообще не вызывают опухоли у новорожденных хомячков. Интересно, однако, что вирус Ad9 (принадлежащий группе D), который не вызывает опухолей у новорожденных хомячков, способен к специфической высокоэффективной индукции фиброаденом молочных желез у крыс [142]. Линии клеток, иммортализованные в процессе трансформации *in vitro* членами различных групп Ad, неодинаковы по своей опухолеродности. Крысинные клетки, трансформированные вирусами группы А, вызывают опухоли у крыс, тогда как вирусы группы С обычно не опухолеродны. Недавно это различие удалось объяснить на молекулярном уровне. Оказалось, что Т-антиген E1A Ad12 специфически подавляет экспрессию трансплантационных антигенов класса I, участвующих в иммунной реакции хозяина [12, 256] (более подробно это будет описано в разд. «Молекулярная биология трансформации клеток»).

Трансформирующие гены аденовирусов человека локализованы в левой части вирусного генома, составляющей 11% его длины. Это было показано с помощью трансфекции культивируемых крысинных клеток специфическими рестрикционными фрагментами ДНК аденовирусов групп С [91], А [265] и В [54, 260]. Все клетки, трансформированные аденовирусами, сохраняли и экспрессировали гены левых трансформирующих областей. Трансформирующие области групп D и Е пока не локализованы. Однако, согласно последним данным, крысинные клетки, трансформированные Ad9 (из группы D), экспрессируют трансформирующие гены E1A и E1B Ad9 [24a]. Трансформирующие гены вирусов в пределах групп А, В и С очень сходны; об этом свидетельствуют результаты жесткой (ДНК — ДНК)-гибридизации (табл. 12.5). Сходство трансформирующих генов разных групп аденовирусов не превышает 20% (по тому же критерию) [73, 180].

Роль аденовирусов в развитии рака у человека

Поскольку аденовирусы человека чрезвычайно широко распространены, онкогенны и часто вызывают латентные инфекции, главный вопрос, на который необходимо было ответить, состоял в том, участвуют ли они в возникновении рака у человека. Опираясь на высокочувствительный метод молекулярной гибридизации, Грин и его коллеги провели огромную работу по поиску трансформирующих генов вирусов групп А, В и С и всего вирусного генома групп D и E в ДНК раковых больных. Ни в одном из случаев, охватывающих в совокупности 90% раковых заболеваний в США, копии аденовирусной ДНК не были обнаружены [95, 102, 178, 179, 299; M. Green, неопубликованные данные]. Это убеждает в том, что аденовирусы всех групп — от А до Е — не участвуют в этиологии рака человека.

Аденовирусы животных

Известно множество аденовирусов, выделенных от разных видов животных: 24 вируса обезьян, 9 вирусов крупного рогатого скота и 11 вирусов птиц (табл. 12.1). Большинство аденовирусов, за исключением аденовирусов птиц, имеют общие группоспецифические детерминанты. В геноме прототипа аденовирусов птиц — аденовируса кур (CELO) — имеются два коротких участка, расположенных в локусах 18,1—19,3 и 57—58 единиц карты (область гена гексона), гомологичных вирусу Ad2 человека [4].

В 1968 г. были получены первые данные о том, что аденовирусная ДНК биологически активна. Оказалось, что ДНК обезьяньего аденовируса 7 (SA7) инфекционна и может индуцировать опухоли у новорожденных хомячков-сосунков [25, 26]. Способность к индукции опухоли сохраняется и у фрагментированной ДНК. Это послужило первым указанием на то, что для проявления онкогенной активности необходима лишь часть вирусного генома [186].

SA7 обладает высокой трансформирующей активностью, а воздействие на эмбриональные клетки хомячка различных химических канцерогенов и мутагенов еще более повышает частоту трансформации [30, 32]. Об этом свидетельствует увеличение содержания интегрированной вирусной ДНК в клетках, трансформированных одновременно с помощью канцерогена и SA7 по сравнению с клетками, трансформированными одним только вирусом [32]. Возможно, химические канцерогены повышают эффективность трансформации клеток вирусом SA7 путем образования ими пробелов в клеточной ДНК, наличие которых активирует репарационную систему клеток; именно в эти пробелы и

встраивается ДНК SA7. Эта гипотеза пока не доказана, поскольку не проведено сравнение физического состояния вирусной ДНК в клетках, трансформированных SA7, и в клетках, трансформированных одновременно SA7 и канцерогеном. Интересно, что, используя эффект усиления трансформирующей активности SA7 химическими канцерогенами, сейчас пытаются разработать метод быстрого тестирования канцерогенов и мутагенов *in vitro* [31].

При введении CELO и пяти других аденовирусов птиц новорожденным хомячкам у них образуются опухоли [130, 249]. В этих опухолях содержится вирусная ДНК и предположительно синтезируется Т-антиген, способный реагировать с сывороткой хомячков, у которых индуцировали опухоли [130]. ДНК CELO встраивается в геном трансформированной клетки вблизи конца молекулы [302]. Об аналогичной схеме интеграции аденовирусов человека сообщалось в работах [106, 108, 111].

Аденовирус-3 крупного рогатого скота также индуцирует опухоли у новорожденных хомячков. Кроме того, он обладает способностью трансформировать мышинные клетки *in vitro* [128]; к этому способны также интактная вирусная ДНК и некоторые рестрикционные ее фрагменты. Трансформирующая область аденовируса локализована в локусе 3,6—19,7 единиц карты [129], что удивительно, поскольку трансформирующие области всех остальных Ad относятся к локусу 1—11.

Герпесвирусы

Члены семейства герпесвирусов обладают одинаковой морфологией, но заметно различаются по своим биологическим свойствам [240]. Выделяют три подсемейства герпесвирусов: альфа, бета и гамма. Подсемейство альфа состоит из вирусов HSV-1 и HSV-2 (они заражают культивируемые клетки самых разных организмов и вызывают в них литическую инфекцию) и из герпесвируса лошадей типа 1 (EHV-1). Подсемейство бета представлено вирусом HCMV, который имеет ограниченный круг хозяев и медленно растет в культуре. Подсемейство гамма включает лимфотропные вирусы EBV, *Herpesvirus saimiri*, *Herpesvirus ateles* и вирус болезни Марека (MDV). Все герпесвирусы могут трансформировать клетки *in vitro*, но опухоли у лабораторных животных индуцируют только гамма-герпесвирусы. Есть убедительные данные о том, что ряд герпесвирусов животных вызывают рак у своих природных хозяев, а некоторые из них играют роль канцерогенов в развитии определенных форм рака у человека (см. ниже).

Вирусы простого герпеса

Онкогенность HSV-1 и HSV-2 была доказана в начале 70-х гг. [58, 59], когда с помощью этих вирусов удалось морфологически трансформировать клетки эмбрионов хомячка в культуре. Из-за высокой литической активности HSV-1 и HSV-2 пришлось сначала подавить их инфекционность с помощью УФ-облучения. Данные об онкогенности были подтверждены в опытах, в которых клетки трансформировали вирусом, чью инфекционность подавляли нагреванием или с помощью фотодинамического эффекта, либо использовали для трансформации температурочувствительные мутанты при непермиссивной температуре. Установлено, что в клетках, трансформированных HSV-1 и HSV-2, транскрибируются вирус-специфические РНК [41]. Однако значение постоянного присутствия вирусного генетического материала в трансформированных клетках осталось невыясненным, поскольку оказалось, что при пассажах трансформированные клеточные линии теряют вирусную ДНК. Специфические рестрикционные фрагменты ДНК HSV-1 и HSV-2 трансформируют клетки эмбрионов крыс и хомячков в культуре и линию клеток мышей NIH/3T3. Однако трансформация в данном случае весьма малоэффективна, а механизм ее неясен (см. разд. «Молекулярная биология трансформации клеток»).

HSV-2 индуцирует одно из хронических, переносимых половым путем венерических заболеваний у мужчин и женщин. Еще в 60-х гг. была высказана гипотеза о том, что существует связь между заражением HSV-2 и развитием рака шейки матки. Эта гипотеза основывалась на результатах сероэпидемиологических обследований, которые показали, что у таких больных специфичные к HSV-2 антитела встречаются чаще и имеют более высокий титр, чем у пациенток контрольных групп (см., например, обзор [229]). Предположение о возможном участии HSV-2 в развитии рака шейки матки подтверждается также данными о том (см. ранее), что HSV-2 может трансформировать клетки *in vitro*. Тем не менее до сих пор в тканях рака шейки матки редко обнаруживали ДНК HSV-2. Недавно появилось несколько сообщений о присутствии вирус-специфической РНК HSV-2 в тканях рака шейки матки у 35—67% больных; эти данные получены с помощью метода гибридизации ДНК—РНК *in situ* [181, 187]. Пока трудно оценить это открытие, особенно если принять во внимание неудачные попытки обнаружить вирусную ДНК в тканях рака шейки матки с помощью обычных методов. Возможно, HSV-2 индуцирует опухоли по механизму «порази-и-беги», при котором вирус нужен только для инициации опухоли, но не для поддержания опухолевого роста [78]. Недавние тщательные сероэпидемиологические обследования, использующие самые со-

временные методы, показали, что никаких различий в распространенности специфических к HSV-2 антител между больными с неоплазией шейки матки и корректно отобранной контрольной группой нет [295a]. Эти данные говорят о том, что для женщин, заразившихся HSV-2, риск развития неоплазии шейки матки остается прежним. Таким образом, результаты данной работы не подтверждают гипотезы об участии HSV-2 в развитии неоплазии. Однако они не исключают возможности инфекционного происхождения этого вида рака. Действительно, в этиологии рака шейки матки, по-видимому, участвуют папилломавирусы человека. Об этом говорят результаты нескольких последних работ, авторы которых показали, что, как правило, в клетках рака шейки матки содержится эписомная ДНК HPV [60, 88, 104]. В работе [310] высказывалось предположение о возможности одновременного участия HSV-2 и папилломавирусов человека в генезисе рака шейки матки. Однако данные, подтверждающие эту идею, пока отсутствуют.

Герпесвирусы лошадей

Выделено три герпесвируса лошадей: EHV-1, 2 и 3. Наиболее интересен вирус EHV-1, который называют также *вирусом аборта лошадей*. Он не просто трансформирует клетки *in vitro*; после трансформации в этих клетках продолжает присутствовать интегрированная вирусная ДНК, структура которой охарактеризована [236] (см. разд. «Молекулярная биология трансформации клеток»). EHV-2 (*цитомегаловирус лошадей*) и EHV-3 (*вирус половой экзантемы лошадей*) тоже способны трансформировать фибробласты эмбрионов хомячка *in vitro* (см. [236]), но свойства клеток, трансформированных этими вирусами, пока не описаны.

Цитомегаловирус человека

Вирус HCMV чрезвычайно широко распространен среди населения Земли. Часто заражение приводит к латентной инфекции. В 1973 г. удалось морфологически трансформировать клетки эмбриона хомячка *in vitro* с помощью HCMV, инфекционность которого подавляли УФ-облучением [3]. Изолированы трансформированные клетки, которые при введении хомячкам-сосункам проявляли опухолеродность, однако ДНК HCMV в трансформированных клетках выявить не удалось (см. обзор [123]). Недавно установлено (путем трансфекции с помощью клонированных рестриктов HCMV), что в двух разных областях генома этого вируса содержатся трансформирующие гены (см. разд. «Молекулярная биология трансформации клеток»). Однако никаких дан-

ных о присутствии в трансформированных клеточных линиях ДНК HCMV по-прежнему получено не было.

Кинетика реассоциации ДНК [123] свидетельствует о том, что ДНК HCMV (в количестве 0,2—6 копий на клетку) присутствует в раковых опухолях предстательной железы, толстой кишки, шейки матки и в саркомах. Капоши, а также в нормальных, неопухолевых тканях предстательной железы, толстой кишки и шейки матки. Таким образом, и нормальные, и опухолевые ткани человека обычно заражены HCMV. Из-за широкой распространенности HCMV не удастся понять, является ли HCMV сопутствующим вирусом или именно он ответствен за трансформацию.

Вирус Эпштейна — Барр

EBV был выделен в 1964 г. Эпштейном и его коллегами из клеток лимфомы Беркита [63]. Этот вирус чрезвычайно широко распространен во всем мире, заражает В-лимфоциты и, как правило, остается латентным; он вызывает главным образом субклиническую инфекцию [147]. Чаще всего заражение EBV приводит к развитию инфекционного мононуклеоза. Однако EBV интересен главным образом в связи с его возможной ролью канцерогенного агента в этиологии лимфомы Беркита и рака носоглотки. Два этих необычных злокачественных заболевания распространены среди определенных этнических групп в отдельных географических регионах. Лимфома Беркита встречается главным образом у детей в некоторых регионах Восточной Африки и Новой Гвинеи. Рак носоглотки распространен среди китайского населения Юго-Восточной Азии и, по-видимому, обусловлен как генетическими факторами, так и факторами окружающей среды. Хотя EBV интенсивно изучается, установить его роль в этиологии лимфомы Беркита и рака носоглотки пока не удастся.

EBV проявляет онкогенность и *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* он с высокой эффективностью трансформирует В-лимфоциты человека и человекообразных приматов, приводя к образованию перманентных линий клеток, которые способны к бесконечной пролиферации в культуре и онкогенны для обезьян. При введении мармозеткам и дурукули EBV может индуцировать лимфопролиферативные заболевания. Вирусную ДНК и вирусные ядерные антигены находят в лимфоидных клетках, полученных с помощью трансформации *in vitro*, и в линиях клеток, полученных из биопсийных проб больных с лимфомой Беркита и раком носоглотки. Природа ДНК EBV, присутствующей в клетках опухолей и трансформированных клетках, полностью не установлена.

Серозидемиологические данные убедительно свидетельствуют о возможном участии EBV в возникновении лимфомы Берки-

та, но все же не могут служить доказательством такого участия. Массовые обследования, проведенные в Уганде, показали, что большинство детей уже в раннем возрасте приобретает антитела к антигену вирусного капсида EBV [52]. У всех детей с лимфомой Беркита по крайней мере за два года до появления клинических симптомов наблюдается более высокий титр антител к антигену вирусного капсида, а у детей с высоким титром вероятность образования лимфомы Беркита в 30 раз выше, чем у детей с нормальным титром. Поскольку все дети этого региона заражены EBV, но не все они больны, был сделан вывод, что EBV, по-видимому, играет роль в этиологии лимфомы Беркита, но в генезисе заболевания принимают участие и другие факторы.

Было высказано предположение, что лимфома Беркита является конечным результатом многоступенчатого канцерогенеза, в котором принимают участие по крайней мере три фактора. Первый из них — массовое заражение EBV детей на первом году жизни, которое приводит к широкому распространению инфицированных EBV В-лимфоцитов. Роль второго фактора, по-видимому, играет перманентная митогенная активность, обусловленная постоянным воздействием на организм антигенов малярии. Третьим фактором может быть обнаруженная в клетках лимфомы Беркита транслокация фрагмента хромосомы 8 в хромосому 14, 2 или 22, каждая из которых кодирует гены иммуноглобулина. В транслоцированном хромосомном сегменте расположен клеточный ген *тус*, гомолог онкогена *тус* ретровируса. Возможно, он активируется при перестройке генома или вследствие его расположения вблизи иммуноглобулиновых генов. Поскольку транслокация хромосомы 8 характерна для большинства В-клеточных злокачественных заболеваний независимо от того, обусловлены ли они заражением EBV, можно думать, что не связанное с EBV перерождение В-клеток в злокачественные инициируется другими канцерогенными агентами.

Рак носоглотки во многих отношениях похож на лимфому Беркита [51]. Во-первых, это заболевание характерно для ограниченного числа географических регионов. Во-вторых, в клетках всех этих опухолей обнаружено множество копий ДНК EBV, а у пациентов, страдающих раком носоглотки, наблюдается высокий титр антител к антигенам вирусного капсида EBV. В отличие от лимфомы Беркита раком носоглотки болеют не дети, а взрослые, и вирус накапливается не в В-лимфоцитах, а в эпителиальных клетках. Обследования показали, что развитию рака носоглотки предшествует повышение титра антител к антигену вирусного капсида. Таким образом, как и в случае лимфомы Беркита, заражение EBV, по-видимому, участвует в развитии рака носоглотки, но лишь при наличии каких-то других факторов.

Вирус болезни Марека

Болезнь Марека — это распространенное и приносящее большой экономический ущерб лимфопролиферативное заболевание кур, которое проявляется в основном в образовании Т-клеточной лимфомы (более подробно см. об этом в работе [213]. Эту болезнь вызывает вирус болезни Марека (MDV) — герпесвирус с длиной генома 150 kb. Он поражает Т-лимфоциты и, как правило, остается связанным с клеткой. Предотвращение болезни Марека живой вакциной свидетельствует об участии MDV в этиологии этого заболевания. Были получены стабильные клеточные линии трансформированных Т-лимфоцитов *in vitro*. И в опухолях, и в культуре на каждую клетку приходится от 20 до 130 эквивалентов вирусного генома. Тем не менее о механизме трансформации клеток под действием MDV известно очень мало.

Герпесвирус Люкке

В 1934 г. Люкке [176] описал почечную аденокарциному, которая часто встречается у американских леопардовых лягушек *Rana pipiens*. В опухолевых клетках и в частично очищенных вирусных препаратах, выделенных из этих клеток, были найдены типичные герпесвирусные частицы. Частично очищенные препараты вируса при введении их головастикам индуцировали опухоли [191]. В природе почечная аденокарцинома Люкке существует в двух температурозависимых состояниях: зимой в опухолях присутствуют вирусные частицы, а летом нет. Если лягушек с «летними», без вирусных частиц, опухолями содержать достаточно долго при температуре 4 °C, то в опухолях начинают синтезироваться вирусные частицы. Это означает, что репликация вируса, по-видимому, чувствительна к температуре. В «безвирусных летних» опухолях лягушек осуществляется транскрипция вирусного генома. Таким образом, трансформированное состояние клеток поддерживается благодаря экспрессии вирусных генов [42]. К сожалению, пока не удается получить вирус в культивируемых клетках, поэтому и нет очищенного препарата вируса, с помощью которого можно было бы индуцировать опухоли и изучать трансформирующие вирусные функции.

Герпесвирусы обезьян

От обезьян Нового Света — беличьей и паукообразной — были выделены два высокоонкогенных герпесвируса — *H. saimiri* и *H. ateles* [68]. Эти вирусы родственны друг другу, поскольку

35% их геномов перекрестно гибридизуется. В отношении организации геномов *H. saimiri* и *H. ateles* отличаются от других герпесвирусов. В вирионах *H. saimiri* обнаружено два типа молекул ДНК: а) инфекционные интактные молекулы М-ДНК с мол. массой от 145К до 170К, состоящие на 70% из L-ДНК (GC-содержание 36%), фланкированной двумя вариabельными фрагментами Н-ДНК (GC-содержание 71%), составляющими 30% всей ДНК; б) дефектные молекулы Н-ДНК, состоящие из длинного тандема повторов. ДНК *H. ateles* по своей структуре похожа на ДНК *H. saimiri*.

H. saimiri широко распространен среди беличьих обезьян (саймири). Его обнаруживают в мозге и других тканях большинства здоровых животных. По-видимому, по отношению к своим природным хозяевам он не патогенен. Однако для некоторых других видов приматов он оказался чрезвычайно онкогенным. Например, у мармозеток злокачественные опухоли лимфатической системы развиваются меньше, чем через два месяца после введения *H. saimiri*. *H. ateles* в этом отношении сходен с *H. saimiri*. Он не патогенен по отношению к своему природному хозяину — паукообразной обезьяне, но является потенциальным индуктором опухолей у мармозеток и других обезьян Нового Света. Выделенная из *H. saimiri* и *H. ateles* ДНК также может индуцировать лимфомы у мармозеток. *H. saimiri* и *H. ateles* индуцируют злокачественные опухоли не только у обезьян, но и у кроликов. Данные о заражении ими людей отсутствуют.

При трансформации *in vivo* первичными мишенями для обоих вирусов, по-видимому, служат Т-лимфоциты. Однако *in vitro* *H. saimiri* трансформирует лимфоциты мармозеток, а *H. ateles* по неизвестной причине нет. Из лимфом, индуцированных *H. saimiri* и *H. ateles*, были получены опухолевые клеточные линии. В трансформированных клеточных линиях на клетку приходится от 4 до 300 копий вирусной ДНК, в основном в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул [69, 139]. Никаких данных, которые указывали бы на интеграцию вирусной ДНК, нет. Было бы весьма интересно продолжить исследования этих высокоонкогенных обезьяньих герпесвирусов.

H. sylvilagus

H. sylvilagus, по-видимому, ответствен за развитие лимфомы у диких кроликов *Sylvilagus* [120]. По клиническим симптомам это заболевание аналогично инфекционному мононуклеозу. У домашних кроликов этот вирус не вызывает болезни, поэтому информация о его онкогенных свойствах весьма ограничена.

HBV-подобные вирусы

Три из четырех HBV-подобных вирусов — HBV, WHV и DHBV, вероятно, вызывают первичный рак печени у своих хозяев (более подробно см. [172, 274]). Судя по эпидемиологическим данным, HBV играют роль в этиологии первичного гепатоцеллюлярного рака у человека. Гепатоцеллюлярный рак — одно из самых распространенных злокачественных заболеваний в мире, хотя в США и в Европе оно встречается относительно редко. В Таиланде же это заболевание находится на втором месте среди всех причин смерти, и на его долю приходится 20% всех случаев раковых заболеваний. Во время массового профилактического обследования населения Таиланда были обследованы 22 707 китайцев [9]. Обнаружилось, что у носителей HBV гепатоцеллюлярный рак встречается гораздо чаще, чем у остальных жителей: вероятность заболеть им для носителей HBV оказалась выше в 223 раза. Эти данные показывают, что развитию гепатоцеллюлярного рака предшествует заражение HBV и подтверждают гипотезу, согласно которой HBV играет главную роль в этиологии этого заболевания.

Интегрированная ДНК HBV найдена в биопсийных пробах, взятых из опухолей большинства больных гепатоцеллюлярным раком [22, 261]. Удивительно, что интегрированная вирусная ДНК обнаружена и в непораженных участках печени больных, а также в печени пациентов — носителей HBV, но не болеющих гепатоцеллюлярным раком [23]. WHV вызывает гепатит и гепатомы у североамериканских сурков [276]. В опухолях печени сурков также обнаружена ДНК WHV, встроенная в клеточный геном [207]. Совокупность этих данных говорит о том, что интеграция вирусной ДНК — это общее явление для WHV-подобных вирусов. Однако роль этой интеграции в онкогенезе пока не ясна (см. разд. «Молекулярная биология трансформации клеток»).

Молекулярная биология трансформации клеток опухолеродными ДНК-содержащими вирусами

На рис. 12.1, А показано, какие молекулярные события происходят в процессе трансформации клетки опухолеродным вирусом, ДНК которого встраивается в клеточный геном и происходит экспрессия специфических вирусных трансформирующих генов, необходимых для поддержания клетки в трансформированном состоянии. О наличии вирусной ДНК в трансформированной клетке судят по результатам молекулярной гибридизации, с помощью которой можно выявить менее одной копии вирусного генома на клетку (рис. 12.1, Б). Этот общий механизм справедлив для хорошо изученных полиомавирусов SV40 и Рv и для адено-

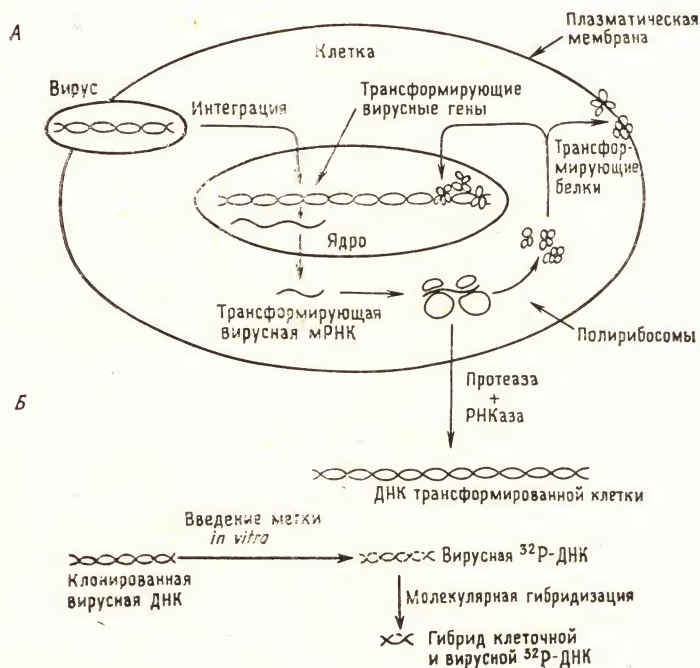


Рис. 12.1. А. Обобщенная схема молекулярных событий, происходящих при трансформации клетки ДНК-содержащими опухолеродными вирусами — членами семейств полиома- или аденовирусов. Вирусная ДНК (вся или частично) встраивается в ДНК клетки-хозяина. Далее происходит транскрипция вирусных генов, кодирующих трансформирующую функцию; молекулы вирусной мРНК подвергаются процессингу и переносятся в цитоплазму. Здесь они транслируются, в результате чего образуются два функциональных класса трансформирующих белков, или Т-антигенов. Один класс белков сосредоточен в клеточном ядре; он осуществляет функцию иммортализации первичных клеток, что ведет к образованию клеточных линий. Второй класс белков связан с плазматической мембраной или с цитоплазматическими мембранными структурами; эти белки ответственны за появление у клетки фенотипических признаков полной трансформации. Б. Обнаружение вирусных генов в трансформированных клетках. ДНК экстрагируют из трансформированных клеток фенолом после предварительной обработки смесью протеазы и РНКазы. Затем ДНК анализируют с помощью молекулярной гибридизации, используя в качестве зонда клонированную вирусную ДНК, меченную *in vitro* [^{32}P]-дезоксирибонуклеотидтрифосфатами. Положительная гибридизация, о наличии которой можно судить по образованию радиоактивных гибридных молекул ДНК, показывает, что в трансформированной клетке сохранены последовательности вирусной ДНК.

вирусов человека групп А, В и С. В случае папилломавирусов функцию сохранения у клетки фенотипических признаков трансформации обеспечивает уже не интегрированный вирусный ген, а сверхспиральная молекула вирусной ДНК, которая реп-

лицируется в виде эписомы. Хотя прямые доказательства того, что папилломавирусы кодируют некий трансформирующий белок, выполняющий функцию поддержания трансформации, пока отсутствуют, тем не менее, по-видимому, это именно так. В настоящее время неясно, как происходит трансформация в случае заражения клеток герпесвирусами, т. е. неизвестно, интегрируются ли специфические вирусные гены и осуществляется ли экспрессия каких-то трансформирующих белков, отвечающих за регуляцию роста. Неизвестен также механизм индукции опухолей HBV-подобными вирусами. Интегрированная вирусная ДНК всегда присутствует в опухолях печени человека и сурков, но данных о наличии в ней гена, ответственного за функцию трансформации, нет.

В обобщенной схеме, приведенной на рис. 12.1, А, показано, что вирусная ДНК встраивается в хромосомную ДНК трансформированной клетки. При этом по современным представлениям ни в вирусном, ни в клеточном геномах нет каких-то специфических сайтов интеграции. Интактными должны быть только те части вирусного генома, которые кодируют трансформирующие гены. Именно они должны экспрессироваться в трансформированной клетке. Вирусные трансформирующие гены транскрибируются клеточной РНК-полимеразой II, после чего происходит процессинг и перенос транскриптов к клеточным полисомам. Там они транслируются с образованием кодируемых вирусом трансформирующих белков (опухолевые антигены, или Т-антигены). В настоящее время обнаружено два класса Т-антигенов (или белковых доменов Т-антигенов) с разными биологическими функциями и разной внутриклеточной локализацией. Один класс антигенов локализован в клеточном ядре. Он выполняет функцию иммортализации первичных клеток, которые в результате приобретают способность к неограниченному росту. Второй класс антигенов связывается с плазматической мембраной или со структурами мембран цитоплазмы. Он ответствен за появление у клеток свойств, характерных для трансформированного состояния.

Идентификацию и картирование трансформирующих генов онколеродных ДНК-вирусов проводили: а) с помощью анализа последовательностей вирусных ДНК, присутствующих в трансформированных и опухолевых линиях клеток; б) путем трансформации клетки посредством переноса генов с помощью специфических рестриктов вирусной ДНК; в) на основании анализа вирусных мутантов, дефектных по своим трансформационным свойствам. Трансформирующие гены SV40 и Ру расположены в ранней области вирусного генома: у BPV-1 — в сегменте, составляющем 69% длины всего генома, у аденовирусов групп А, В и С — в ранней области 1, расположенной в левом участке, состав-

ляющем 11% длины генома, у герпесвирусов — в одном (HSV-1 и ENV-1) или в двух (HSV-2 и HCMV) участках вирусной ДНК.

Работы по изучению организации и экспрессии трансформирующих областей полнома- и аденовирусов показали, что эти вирусы содержат перекрывающиеся гены, которые кодируют семейства частично родственных друг другу Т-антигенов. Таким образом, интерпретация экспериментов по переносу генов ДНК-фрагментами осложняется тем, что в них всегда присутствует не один, а несколько генов, кодирующих Т-антигены. Недавно для исследования процесса трансформации клетки и онкогенности были сконструированы плазмиды, содержащие только монофункциональные гены вирусных Т-антигенов. Их применение позволяет прояснить функции отдельных вирусных Т-антигенов и их доменов. Кроме того, эти исследования проливают свет на изменения ростовых свойств, которые наблюдаются во время многоступенчатого процесса перехода первичных клеток сначала в иммортализованные, а затем в полностью трансформированные. Далее мы рассмотрим современные представления о молекулярной биологии трансформации клеток различными ДНК-содержащими опухолеродными вирусами.

Полиомавирусы

Организация и экспрессия трансформирующих генов у SV40 и у вируса полиомы

Геномы SV40 и Ру хорошо охарактеризованы. Они представляют собой ковалентно замкнутые кольцевые молекулы ДНК, нуклеотидная последовательность которых полностью установлена [285]. На рис. 12.2 приведены физические карты геномов SV40 и Ру, на которых показано расположение последовательностей, кодирующих вирусные белки. Вирусный геном подразделяют на 100 единиц, нумеруя их по часовой стрелке и произвольно выбирая за начало отсчета сайт рестрикции эндонуклеазой *EcoRI*. *Ori* — это сайт инициации двунаправленной репликации ДНК. Ранняя область соответствует половине вирусного генома, транскрибируемой в направлении против часовой стрелки у SV40 и по часовой — у Ру. При продуктивной вирусной инфекции пермиссивных клеток ранние вирусные гены экспрессируются до начала репликации вирусной ДНК; эти ранние гены детерминируют трансформирующие функции вируса. После начала репликации транскрибируются поздние вирусные гены, при этом направление транскрипции меняется на противоположное. Поздние вирусные гены кодируют три вирусных капсидных белка — VP1, VP2 и VP3, которые в трансформации клетки не участвуют.

При инфекции непермиссивных или полупермиссивных клеток

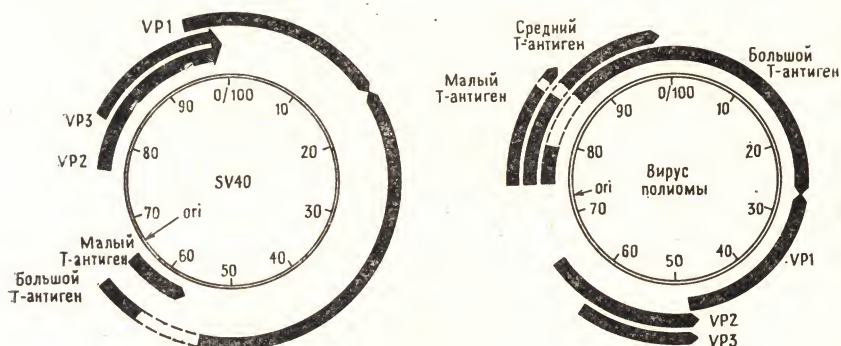


Рис. 12.2. Генетические карты, на которых указаны области, кодирующие Т-антигены SV40 и Ру, и вирусные структурные белки (VP). Вирусный геном разбит на 100 частей (единиц карты), пронумерованных против часовой стрелки; за начало отсчета принят уникальный *EcoRI*-сайт рестрикции. *Ori* — точка, с которой начинается двунаправленная репликация ДНК. Ранняя область, кодирующая Т-антигены, находится в той части вирусного генома, которая транскрибируется у SV40 в направлении против часовой стрелки от *ori*, а у Ру — по часовой стрелке. Области, кодирующие Т-антигены, показаны черными стрелками; пунктиром выделены интроны. Матрицами большого и малого Т-антигенов SV40 служат две разные молекулы мРНК, происходящие от общей молекулы РНК-предшественницы. Оба Т-антигена SV40 до сайта сплайсинга транслируются с рамкой считывания 1. После сайта сплайсинга трансляция большого Т-антигена продолжается с рамкой считывания 2. Матрицами большого, среднего и малого Т-антигенов Ру служат три по-разному сплайсированные молекулы мРНК. До сайта сплайсинга все три Т-антигена транслируются с рамкой считывания 1. После сайта сплайсинга средний Т-антиген транслируется с рамкой считывания 2, а большой Т-антиген — с рамкой считывания 3.

экспрессируется ранняя область вирусного генома, несущая трансформирующие гены. В хозяйских клетках индуцируется синтез клеточной ДНК, может осуществиться несколько актов деления и временно проявиться свойства, характерные для трансформированного фенотипа. Это явление называют *абортивной трансформацией*; оно носит преходящий характер, поскольку большинство клеток теряет вирусную ДНК и возвращается к нормальному фенотипу. Однако незначительная часть клеток стабильно интегрирует и непрерывно экспрессирует вирусные ранние гены, т. е. эти клетки остаются стабильно трансформированными.

Ранняя область SV40 и Ру кодирует вирусные Т-антигены. Т-антигены — это по определению белки, синтезируемые инфицированными и трансформированными клетками, реагирующие с сывороткой животного, у которого данным вирусом индуцирована опухоль. Несмотря на чрезвычайное сходство в организации вирусных геномов SV40 и Ру, эти вирусы заметно различаются по устройству ранних генов и по числу кодируемых каждым ви-

русом Т-антигенов (см. рис. 12.2). SV40 кодирует два Т-антигена: большой, с мол. массой 94К, и малый, с мол. массой 17К. Р_у кодирует три Т-антигена: большой, средний и малый, мол. массы которых равны 100К, 55К и 22К соответственно. Т-антигены SV40 и Р_у транслируются с индивидуальных мРНК. Эти мРНК происходят от одного первичного транскрипта, сплайсинг которого может осуществляться двумя или тремя альтернативными способами.

Большой и малый Т-антигены SV40 имеют общий N-концевой участок (рис. 12.2), а С-концевая область малого Т-антигена SV40 кодирована в интроне, который во время сплайсинга мРНК, кодирующей большой Т-антиген, отщепляется. Аналогичным образом одинакова N-концевая последовательность и у большого, малого и среднего Т-антигенов. Но малый и средний Т-антигены Р_у, кроме того, содержат участки, отсутствующие у большого Т-антигена, поскольку они детерминируются интроном, который у мРНК, кодирующей большой Т-антиген, отщепляется при сплайсинге. С-концевую часть молекулы среднего Т-антигена Р_у кодирует уникальный участок, расположенный дистально от места выщепления интрона; этот участок транслируется с другой рамкой считывания, чем в случае большого Т-антигена (рис. 12.2). Геном SV40 имеет эквивалентный участок с открытой рамкой считывания в 3'-концевой ранней области [183], но пока не удалось идентифицировать ни одного белка SV40, который кодировался бы этой областью.

Свойства и функции большого и малого Т-антигенов SV40

Исследования температурочувствительных (*ts*) мутантов SV40, несущих мутации в области, кодирующей большой Т-антиген, и мутантов с делециями в области, кодирующей малый Т-антиген, привели к следующим выводам: а) большой Т-антиген нужен для инициации клеточной трансформации; б) для поддержания у клетки трансформированного фенотипа необходима непрерывная экспрессия большого Т-антигена; в) малый Т-антиген для трансформации не нужен, но в определенных условиях он, вероятно, играет роль усилителя. Большой Т-антиген SV40 состоит по крайней мере из двух функциональных доменов. Трансфекцией рекомбинатными плазмидами, кодирующими лишь N-концевую часть большого Т-антигена SV40, удается достичь иммортализации культур фибробластов крысиных эмбрионов и их неограниченного деления [38, 40]. Иммортализованные клеточные линии по своим фенотипическим признакам варьируют от нормальных до трансформированных; это обусловлено в основном различиями во вкладе продуктов клеточных генов в фено-

тип клетки. Малый Т-антиген SV40 в иммортализации не участвует [40].

Большой Т-антиген SV40 — это замечательный полифункциональный белок (более подробно см., например, в работе [235]). Его биохимические свойства достаточно хорошо изучены благодаря тому, что сейчас удается получать в заметном количестве очищенные препараты этого белка и родственных ему гибридных белков [110, 284]. В табл. 12.6 перечислены функции, приписываемые этому белку. Домены большого Т-антигена, которые отвечают за некоторые из этих функций, картированы. Чрезвычайно полезными для работ по картированию оказались эксперименты по переносу генов плазмидами, содержащими ДНК SV40 со специфическими делециями [222, 268].

Таблица 12.6. Молекулярные функции большого Т-антигена SV40

Функция	Область гена Т-антигена, ответственная за данную функцию (по номерам нуклеотидов)
Специфическое связывание с вирусной ДНК	4600—4000
Инициация репликации вирусной ДНК	4600—4000 (?)
Ауторегуляция ранней вирусной транскрипции	4600—4000 (?)
Индукция поздней вирусной транскрипции	Неизвестна
АТРазная активность	»
Протеникиназная активность (?)	»
Связывание с клеточной ДНК	4100—3800
Инициация репликации клеточной ДНК	?
Связывание с белком р53	Неизвестна
Активация транскрипции рДНК	3800—3500
Индукция синтеза клеточных ферментов	Неизвестна
Активация транскрипции клеточных генов	»
РНК-полимеразой II	»

Трансформация клеток вирусом SV40 — это сложный процесс, включающий множественные перестройки различных областей клетки. Пока не удается связать специфические биохимические свойства большого Т-антигена SV40 с определенными биологическими характеристиками трансформированной клетки. Для объяснения механизма действия вирусных трансформирующих белков предложено две гипотезы (более подробно см. в работе [184]). Одна из них состоит в том, что трансформирующие белки «работают» на плазматической мембране, модифицируя специфические функции, существенные для роста клеток. Согласно второй гипотезе, трансформирующие белки функционируют в ядре и осуществляют регуляцию репликации ДНК и экспрессии генов. Известные свойства большого Т-антигена SV40 совмести-

мы с обеими гипотезами. Основная часть молекул большого Т-антигена находится в ядре трансформированной клетки, где они связаны с нуклеоплазмой, хроматином и ядерным матриксом [271]. Функционирование в ядре согласуется а) с изменениями синтеза макромолекул, наблюдаемыми в клетках, трансформированных SV40, в частности со стимуляцией репликации клеточной ДНК [283]; б) с повышением синтеза рибосомной РНК [127]; в) с индукцией синтеза клеточных ферментов [223]; г) с активацией транскрипции специфических клеточных генов [257, 258]; д) со специфическим связыванием с клеточным белком р53, находящимся в ядре.

р53 — это связанный с трансформацией клеточный белок. Впервые он был обнаружен в составе прочного комплекса с большим Т-антигеном SV40 в трансформированных мышинных клетках [163]. Аналогичный комплекс образуется между каким-то иммунологически неотличимым от р53 белком и большим Т-антигеном Е1В Ad [250]. Последние работы подтверждают участие белка р53 в регуляции клеточного роста [190].

«Мембранное» функционирование большого Т-антигена SV40 в процессе трансформации подтверждается тем, что минорная фракция (модифицированная форма) большого Т-антигена локализуется в плазматической мембране клеток, трансформированных SV40. По-видимому, С-концевой домен большого Т-антигена SV40 погружен в мембрану, а N-концевой располагается на поверхности клетки [50]. Вероятно, именно присутствием большого Т-антигена SV40 на клеточной поверхности и объясняется усиленный перенос питательных веществ через мембрану, который наблюдается у клеток, трансформированных SV40. Возможно, с этим связана и способность трансформированных клеток расти в обедненной сывороткой среде. Интересно также, что большой Т-антиген SV40 прочно связан с клеточным белком р53 как на поверхности, так и внутри трансформированных клеток [248]. Может быть, взаимодействие большого Т-антигена с р53 на поверхности клетки играет решающую роль в поддержании клеток в трансформированном состоянии. К сожалению, пока невозможно отличить изменение биологических и биохимических свойств, индуцируемых большим Т-антигеном SV40 и существенных для процесса трансформации, от изменений, представляющих собой последствия того, что клетка трансформирована.

Свойства и функции большого, среднего и малого Т-антигенов полиомавирусов

Роль трех Т-антигенов вируса Рv в трансформации клеток довольно сложна (см., например, прекрасную работу [266]). По некоторым данным особенно важную роль играет средний Т-ан-

тиген. С его помощью можно трансформировать иммортализованные линии клеток, однако для трансформации первичных эмбриональных клеток в культуре его недостаточно. Начальная стадия трансформации первичных клеток, которую называют «иммортализацией», требует присутствия N-концевого домена большого Т-антигена. И наконец, чтобы согласовать действия среднего и большого Т-антигенов в процессе трансформации, нужен малый Т-антиген. Изложим теперь экспериментальные данные, на которых основаны эти утверждения.

Клетки, трансформированные вирусом полиомы, всегда содержат средний и малый Т-антигены, но редко — весь большой Т-антиген [132]. Связано это с тем, что интегрированная вирусная ДНК часто оказывается оборванной на конце, кодирующем С-концевой домен большого Т-антигена, поэтому синтезируется укороченный антиген. Изучение роли индивидуальных Т-антигенов Рv в процессе трансформации клетки с помощью ДНК-фрагментов осложняется тем, что последовательности, кодирующие три Т-антигена, перекрываются. Чтобы разграничить функции Т-антигенов, были сконструированы рекомбинантные плазмиды, содержащие модифицированные ранние области Рv, которые кодируют монофункциональные Т-антигены. В плазмиде, детерминирующей средний Т-антиген и не детерминирующей большой и малый, были удалены последовательности интрона среднего Т-антигена; при этом были удалены акцепторы сплайсинга мРНК большого и малого Т-антигенов. Поскольку для синтеза мРНК среднего Т-антигена сплайсинг не обязателен, этот синтез протекал нормально [288]. Трансфекция иммортализованной линии крысиных клеток плазмидой, кодирующей лишь средний Т-антиген, привела к образованию трансформированных клеточных линий, которые формировали колонии в полужидкой среде и индуцировали опухоли у крыс, т. е. обладали двумя основными признаками, характерными для трансформированного состояния [227, 288]. Эти работы показали, что главные трансформирующие функции Рv обеспечивает средний Т-антиген, т. е. он ответствен именно за такие изменения в клеточных механизмах регуляции, которые чаще других встречаются у полностью трансформированной клетки. Однако трансформированные клетки, полученные путем трансфекции плазмидой, кодирующей средний Т-антиген, отличаются от клеток, трансформированных плазмидой, кодирующей все три Т-антигена. Первые не способны расти в среде с малым количеством сыворотки (0,5%), хотя в среде, содержащей 10% сыворотки, они растут хорошо. Таким образом, в обедненной сывороткой среде преимущественно из-за ограниченного количества специфических факторов роста трансформированные средним Т-антигеном клетки становятся по своим свойствам похожи на нетрансформированные [227]. Способность со-

хранять трансформированное состояние в обедненной сывороточными факторами роста среде эти клетки приобретали при последующей трансфекции плазмидой, кодирующей интактный большой Т-антиген или 40% N-концевых остатков большого Т-антигена. Трансфекция плазмидой, кодирующей малый Т-антиген Ру, не устраняла зависимости от содержания сыворотки в среде. Таким образом, экспрессия N-концевой части большого Т-антигена может дополнять трансформирующую функцию среднего Т-антигена; это свидетельствует о том, что при низком содержании сыворотки в среде большой Т-антиген играет какую-то роль в поддержании клеток в трансформированном состоянии.

В экспериментах, направленных на дальнейшее исследование функций индивидуальных Т-антигенов Ру, первичные фибробласты мышиных и крысиных эмбрионов трансфицировали плазмидами, несущими разделенные гены большого, среднего и малого Т-антигенов. Плазида, содержащая всю раннюю кодирующую область Ру, трансформировала первичные клетки, а плазида, кодирующая только средний Т-антиген, — нет [227]. Самое интересное, что трансфекция первичных клеток грызунов плазмидой, несущей лишь ген большого Т-антигена, приводила к образованию плоских колоний в разреженных культурах с той же частотой, что и трансформация клеток инфекционным вирусом [228]. Клеточные линии, полученные в результате трансфекции плазмидой, которая содержала ген большого Т-антигена, имели нормальный фенотип, т. е. характеризовались низкой плотностью насыщения на пластиковой подложке и не были способны к размножению в полужидкой среде (без возможности прикрепления к подложке). Однако те же линии могли расти при более низкой концентрации сыворотки в среде, чем спонтанные клеточные линии грызунов. Способность большого Т-антигена к иммортализации клеток сохраняется и у одного N-концевого домена, что следует из экспериментов по трансфекции плазмидой, кодирующей только левые 40% большого Т-антигена Ру. О перманентной потребности в функционировании большого Т-антигена для поддержания иммортализованного состояния свидетельствуют результаты экспериментов с *ts*-мутантами, кодирующими термолabileмный большой Т-антиген [228].

Клеточные линии, полученные после трансфекции первичных клеток грызунов фрагментами ДНК Ру, кодирующими большой Т-антиген, удавалось трансформировать плазмидой, кодирующей средний Т-антиген. Эти трансформанты делились до такой же высокой плотности насыщения и проявляли столь же высокую эффективность образования клонов в полужидком агаре, что и клетки, трансформированные вирусом дикого типа. Любопытно, однако, что одновременная трансфекция плазмидами, несущими гены большого и среднего Т-антигенов, не приводила к трансфор-

мации первичных клеток: нужна была трансфекция еще и геном малого Т-антигена [228]. Функция, с помощью которой малый Т-антиген осуществляет согласование трансформации первичных клеток большим и средним Т-антигенами, неизвестна.

Работы по изучению онкогенности плазмид, кодирующих индивидуальные Т-антигены Р_у, показали, что один средний Т-антиген не может индуцировать опухоли у новорожденных крысят [7]. Удивительно, что введение рекомбинантной плазмиды, содержащей функциональный средний Т-антиген, вместе с другой плазмидой, содержащей гены *либо* большого Т-антигена, *либо* малого, приводит к развитию у них опухолей. Объяснить эту кажущуюся эквивалентность малого и большого Т-антигенов в процессе индукции опухолей пока не удается.

Описанные выше исследования предполагают, что в процессе перерождения первичной клетки в полностью трансформированную происходит множество последовательных изменений в регуляции клеточного роста. Некоторые из них могут индуцироваться экспрессией индивидуальных Т-антигенов, тогда как другие в культивируемых клетках происходят спонтанно. Например, экспрессия большого Т-антигена может привести к иммортализации клеток (т. е. к их неограниченному делению) и к появлению у них способности расти в обедненной сывороткой среде, что невозможно в случае нетрансформированных клеток или клеток, трансформированных средним Т-антигеном Р_у. Если длительное время поддерживать первичные клетки *in vitro*, могут спонтанно образоваться иммортализованные клеточные линии; следовательно, функция иммортализации, которую выполняет большой Т-антиген, может возникнуть случайно, чего нельзя сказать о функции «независимости от высокого содержания сыворотки». Средний Т-антиген индуцирует полностью трансформированный фенотип, но только у иммортализованных (случайно или с помощью большого Т-антигена) клеток. Как мы уже говорили, функция, которую выполняет малый Т-антиген при согласованной трансформации клетки всеми тремя Т-антигенами, неясна, однако ее вполне заменяет какое-то изменение в клетке, которое происходит после ее иммортализации большим Т-антигеном. Способность как малого, так и большого Т-антигенов дополнять средний Т-антиген при индукции опухолей показывает, что функции Т-антигенов в процессе трансформации клетки не эквивалентны тем функциям, которые они выполняют при индукции опухолей.

Биохимические функции среднего Т-антигена полиомавируса

Работы по изучению механизма действия Т-антигенов Р_у при индукции трансформации клетки только начинаются. Как и в

случае SV40, при трансформации клетки Ру изменяются многие ее биологические и биохимические свойства. Из-за плейотропной активности Т-антигенов несомненно происходит также множество вторичных событий. Изучение механизма действия Т-антигенов сдерживается отсутствием чистых препаратов Т-антигенов Ру. Выделение и очистка Т-антигенов Ру затруднены тем, что в инфицированных и трансформированных клетках эти белки представлены в незначительном количестве и довольно часто связаны с нерастворимыми клеточными структурами. Роль среднего Т-антигена Ру в трансформации клетки можно объяснить двумя его свойствами, о которых говорилось выше, — локализацией в мембранных структурах и сопутствующей протеинкиназной активностью.

Согласно имеющимся данным, средний Т-антиген Ру распределен по разным областям клетки. При биохимическом фракционировании его обнаруживают как в плазматической мембране, так и в ядерной фракции [259]. Иммуофлуоресцентная микроскопия свидетельствует о локализации среднего Т-антигена в ядерной мембране, а иммуоэлектронная микроскопия — о его связи главным образом с мембранными структурами цитоплазмы [109]. Тем не менее считается, что функциональный средний Т-антиген локализован в плазматической мембране. Это очень важно, поскольку по современным представлениям плазматической мембране принадлежит главная роль в регуляции клеточного роста; кроме того, это интересно из-за аналогии с трансформирующим белком р60^{src} вируса саркомы Рауса, который также находится на внутренней поверхности плазматической мембраны (более подробно см. в работе [13]).

Средний Т-антиген содержит около 30% гидрофобных аминокислот, что согласуется с его локализацией в мембране. Однако N-концевая аминокислотная последовательность среднего Т-антигена отличается от N-концевой сигнальной последовательности тех белков, которые ориентированы к наружной поверхности плазматической мембраны [266]. На С-конце среднего Т-антигена располагается участок из 20 гидрофобных остатков, сходный с трансмембранными участками белков, «заякоривающими» их в плазматической мембране. Исследования делеционных [205] и точечных [29] мутантов подтверждают представление о том, что для трансформации клетки, индуцируемой средним Т-антигеном, С-концевая гидрофобная область существенна и что эта С-концевая область связывается с плазматической мембраной [29].

Со средним Т-антигеном Ру связывают протеинкиназную активность, ответственную за уникальную реакцию фосфорилирования гидроксильной группы тирозиновых остатков в белках [61]. Сопутствующая среднему Т-антигену протеинкиназа — это

первый случай фермента данного типа, специфичного по отношению к тирозину. Позже было установлено, что тирозинспецифичной протеинкиназной активностью обладают и некоторые белки, кодируемые онкогенами ретровирусов, а также эпидермальный фактор роста (более подробно см. в работе [13]). Например, получены убедительные данные о том, что кодируемый вирусом саркомы Рауса белок $pp60^{src}$ обладает протеинкиназной активностью, которая играет ключевую роль в процессе трансформации [13]. Однако доказать, что протеинкиназная активность, связанная со средним Т-антигеном, кодируется вирусом и что эта протеинкиназа принимает участие в трансформации клетки, не удалось (более подробно см. в работе [266]). В частности, обнаружилось, что клетки, трансформированные онкогенным ретровирусом, кодирующим протеинкиназы, характеризуются повышенным уровнем фосфотирозина, а клетки, трансформированные Ру, — нет.

В работе [259] сообщалось, что часть молекул среднего Т-антигена Ру в трансформированных клетках фосфорилирована. Большинство этих молекул локализовано во фракции плазматических мембран; у них фосфорилированы в основном остатки треонина и в меньшей степени остатки серина и тирозина. Большая же часть протеинкиназной активности (80—90%), которая приводит к специфическому фосфорилированию тирозиновых остатков среднего Т-антигена, обнаруживается в плазматической мембране. Из этих данных следует, что по тирозиновым остаткам фосфорилируется только та часть среднего Т-антигена, которая локализована в плазматической мембране, или что те формы среднего Т-антигена, которые фосфорилированы по тирозиновым остаткам, мигрируют к плазматической мембране. Высказывалось также предположение, что фосфорилирование среднего Т-антигена по треониновым и сериновым остаткам осуществляется при участии клеточной протеинкиназы и это в свою очередь активирует связанную со средним Т-антигеном протеинкиназную активность.

Недавно появилось сообщение о том, что часть молекул среднего Т-антигена образует стабильный комплекс с $pp60^{c-src}$ — клеточным гомологом протеинкиназы $pp60^{src}$ вируса саркомы Рауса [44]. Комплекс был выделен с помощью иммунопреципитации антителами, специфичными к среднему Т-антигену или $pp60$. Этот результат свидетельствует о том, что связанная со средним Т-антигеном протеинкиназная активность присуща $pp60^{c-src}$, а не собственно среднему Т-антигену. Это также указывает на участие в процессе трансформации клетки некой функции, по-видимому, общей у онкогенных ретро- и полиома-вирусов.

Биохимические функции большого Т-антигена полиомавируса

Судя по результатам биохимического фракционирования, иммунофлуоресцентной микроскопии и иммуноэлектронной микроскопии [109], большой Т-антиген присутствует в определенных областях нуклеоплазмы. Некоторое количество молекул большого Т-антигена Р_у обнаружено также во фракции плазматических мембран, но смысл этого результата пока неясен [259].

Сравнение с большим Т-антигеном SV40 показывает, что большой Т-антиген Р_у выполняет существенно меньше функций. Он связывается с точкой начала репликации вирусной ДНК [81] и обладает АТРазной активностью [80]. Как и в случае SV40, большой Т-антиген Р_у, вероятно, инициирует репликацию вирусной ДНК и регулирует транскрипцию вирусного генома. Очевидно, большой Т-антиген Р_у также индуцирует цикл репликации клеточной ДНК [254].

Биохимические функции малого Т-антигена полиомавируса

Малый Т-антиген Р_у нужен при одновременной трансформации первичных клеток грызунов средним и большим Т-антигенами и при индукции опухоли средним Т-антигеном. Никаких сведений о его биохимических свойствах пока нет.

Папилломавирусы

Папилломавирусы представляют собой интереснейшие модельные системы для изучения молекулярной биологии индуцируемого вирусами онкогенеза, поскольку и в естественных условиях для них характерна экспрессия онкогенов и наблюдается тесная взаимосвязь между экспрессией вирусного генома и состоянием дифференцировки хозяйской клетки (более подробно см. в работе [47]). Изучение молекулярно-биологических основ трансформации клетки папилломавирусами сдерживается из-за отсутствия систем культур пермиссивных клеток, в которых можно было бы осуществлять репликацию вируса и изучать экспрессию вирусных генов. Недавние работы по анализу последовательности ДНК клонированных геномов BPV-1, HPV-1 и HPV-6 предоставили в наше распоряжение уникальные сведения о молекулярной организации и экспрессии генов папилломавирусов. Кроме того, исследование процесса транскрипции позволило идентифицировать специфические вирусные РНК в опухолях, индуцированных папилломавирусами, и в трансформированных клетках, в которых происходит частичная экспрессия вирусного генома, а кроме того, на дифференцированной периферии инду-

цированных вирусом бородавок, где происходит размножение вируса и где, очевидно, экспрессируется весь вирусный геном. Ранние вирусные белки в трансформированных клетках или в опухолях пока не идентифицированы; неясна и природа продуктов вирусных генов, предположительно вовлеченных в трансформацию клетки.

Репликация ДНК папилломавирусов в опухолях и трансформированных клетках

Физическое состояние вирусного генома в папилломах и карциномах, индуцированных у кроликов папилломавирусом кроликов *Sylvilagus* (CRPV), в природных саркоидных опухолях лошадей, где содержатся геномы BPV, и в опухолях человека, содержащих HPV, изучали методом блот-гибридизации ДНК. Практически во всех случаях вирусный геном был представлен в форме единичных неинтегрированных замкнутых кольцевых молекул ДНК, которые в большинстве обследованных опухолей реплицировались в виде эписом; интегрированную форму вирусной ДНК удалось обнаружить лишь в нескольких случаях [297]. В саркоидных опухолях лошадей содержалось до 50 копий эписомных молекул ДНК единичной длины на клетку [6, 158, 159]. Аналогичное количество — от 40 до 50 копий эписомной ДНК CRPV — содержалось в перевиваемых карциномах VX2 и VX7 [66]. В карциномах домашних кроликов были обнаружены большие мультимерные эписомные молекулы ДНК CRPV [297]. В опухолях человека геном HPV, как правило, присутствует в виде кольцевой эписомной ДНК геномного размера, однако в нескольких случаях были также обнаружены субгеномные фрагменты вирусной ДНК [60, 88, 104, 209, 211, 306].

Индукцируемая BPV-1 очаговая трансформация мышинных клеток в культуре — единственная модельная система, пригодная для изучения трансформации с помощью папилломавирусов. Трансформированные клетки способны расти без прикрепления к подложке и могут вызывать опухоли у мышей *nud*. Используя метод подсчета очагов трансформации, удалось локализовать ген, определяющий способность BPV-1 индуцировать трансформацию, в *Bam* HI/*Hind* III-рестрикте длиной 5,4 kb, представляющем собой 69% вирусного генома, длина которого составляет 7,9 kb [173] (рис. 12.3). Клетки, трансформированные интактными молекулами вирусной ДНК или этим фрагментом, содержат множество копий эписомной вирусной ДНК и не содержат интегрированных последовательностей вирусной ДНК [168]. Клетки, трансформированные интактной ДНК BPV-1, экспрессируют вирусные РНК, закодированные исключительно в вирусном фрагменте длиной 5,4 kb (см. далее).

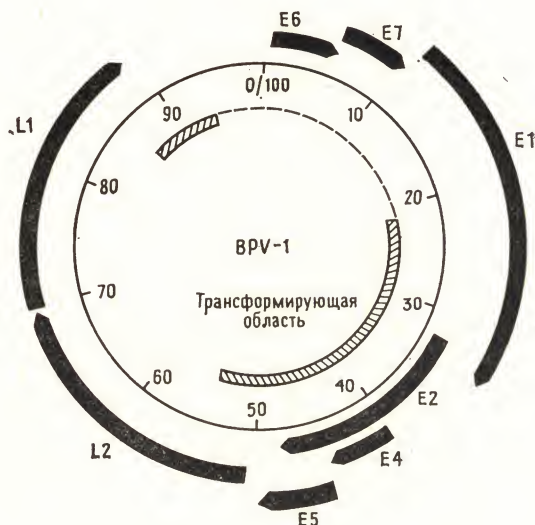


Рис. 12.3. Генетическая карта, на которой показаны области генома BPV-1, транслируемые с открытыми рамками считывания и кодирующие предполагаемые (исходя из нуклеотидной последовательности ДНК) ранние белки E1—E8 и предполагаемые поздние L1 и L2 [33]. Ранние белки локализованы в сегменте генома, составляющем 69% его длины, который обладает способностью трансформировать мышинные клетки *in vitro* [173]. Вирусный геном разбит на 100 частей (единиц карты), пронумерованных по часовой стрелке, начиная с уникального сайта расщепления рестриктазой *Hpa*I. Основные открытые рамки считывания, кодирующие предполагаемые белки BPV-1, располагаются в одной и той же цепи ДНК и читаются со всеми тремя трансляционными рамками считывания.

Были сконструированы мутантные ДНК BPV-1, содержащие делеции, и исследована их способность к трансформации культивируемых мышинных клеток. Оказалось, что для трансформации клетки требуется присутствие двух участков вирусной ДНК [197]. Первый участок расположен в некодирующей области вблизи 5'-конца трансформирующего фрагмента (рис. 12.3; единицы карты 85—95) и, очевидно, является регуляторной последовательностью, о чем свидетельствует следующий результат: длинный концевой повтор (LTR) вируса мышинной саркомы Харви, который содержит последовательности, ответственные за усиление, стимуляцию и инициацию транскрипции, функционально заменим 5'-концевым участком трансформирующего фрагмента ДНК BPV. Второй участок расположен в 3'-концевой области трансформирующего фрагмента (рис. 12.3; единицы карты 23—55) и, очевидно, кодирует трансформирующий белок (белки) BPV-1. Интересно, что последовательность длиной 59 bp,

расположенная на удаленном конце раннего транскрипционного элемента BPV-1 (рис. 12.3; единица карты 55), выполняет функцию активатора экспрессии генов и необходима для трансформации клетки BPV-1 [177].

Делеция участков вирусной ДНК, расположенных между двумя важными для трансформации сегментами, лишает ДНК BPV-1 способности к репликации в виде эписомы. Однако геном с такими делециями сохраняет способность трансформировать клетки [197]. Таким образом, последовательности ДНК, которые кодируют функцию трансформации, независимы от участков, необходимых для репликации эписом. Система BPV-1 представляет собой хорошую модель для изучения вирусных и клеточных функций, нужных для поддержания вирусной ДНК в виде эписомы.

Челночные векторы на основе BPV-1

Используя способность ДНК BPV-1 реплицироваться в виде эписомы, удалось с помощью ДНК-опосредованного переноса генов и последующего отбора трансформированных клеток по морфологическим признакам создать на основе этой ДНК вектор для введения чужеродных генов в клетки мыши [252]. В результате были сконструированы рекомбинантные плазмиды, которые реплицируются в виде эписом как в мышинных, так и в бактериальных клетках [251, 252]. Этот тип вектора, с помощью которого можно переносить гены от млекопитающих к бактериям и обратно, оказался незаменимым для репликации эукариотических генов в бактериях, а также для изучения их структуры, экспрессии и функций в окружении определенных последовательностей в виде неинтегрированной, многокопийной плазмиды. К настоящему времени несколько чужеродных генов введено в мышинные клетки в виде рекомбинантов с вектором BPV и показано, что в трансформированных клетках происходит экспрессия этих генов. К ним относятся гены, кодирующие препроинсулин крыс [252], бета-глобин [55], бета-интерферон [308] и гормон роста [212] человека. Рекомбинантные BPV, содержащие ген интерферона со специфическими делециями, были использованы для выявления последовательностей ДНК, которые регулируют экспрессию бета-интерферона [307]. Недостаток вектора BPV-1 состоит в том, что с его помощью можно трансформировать только мышинные клетки.

Экспрессия геномов CRPV и BPV-1

Работы по изучению экспрессии генома папилломавирусов сдерживаются из-за отсутствия адекватных экспериментальных систем, крайне низкого уровня транскрипции РНК в клетке и

отсутствия иммунологических реагентов для идентификации кодируемых вирусом ранних белков. Недавно было опубликовано несколько работ по изучению транскрипции папилломавирусов. Они показали, что в естественных и экспериментально индуцированных опухолях, в клетках, трансформированных *in vitro*, в культурах клеток опухолей, индуцированных папилломавирусом, а также в клеточных линиях, полученных трансформацией папилломавирусной ДНК, происходит экспрессия вирусной РНК.

Судя по кинетике реассоциации, папилломы диких североамериканских кроликов, в которых обнаруживается вирус, содержат специфические РНК CRPV со степенью комплементарности вирусному геному 9—32%; опухоли домашних кроликов, не продуцирующие вирус, содержат последовательности, комплементарные лишь 6—12% вирусного генома [296]. Вирусные транскрипты в опухолевых клетках представлены в очень незначительной концентрации. Что касается вирус-специфических белков, то их вообще не удается обнаружить, применяя иммунофлуоресцентную микроскопию с использованием опухолевых сывороток. Однако методом блот-гибридизации РНК было выявлено два транскрипта CRPV длиной 1,3 и 2,0 kb как в доброкачественных, так и в злокачественных опухолях домашних кроликов, а также в клетках трансплантируемой опухоли VX7 [198]. Результаты картирования РНК свидетельствуют о том, что эти транскрипты колинеарны и подвергались сплайсингу. Поскольку оба они связываются с полисомами, можно думать, что это молекулы мРНК, которые транслируются с образованием вирусных белков и, таким образом, играют какую-то роль в трансформации.

Анализ транскрипции генома BPV-1, проведенный с помощью РНК, выделенной из трансформированных клеток мыши и хомячка, не продуцирующих вирус [5, 118], выявил несколько видов РНК BPV-1, которые присутствуют в количестве 15—30 копий на клетку. Это очень мало, если учесть, что каждая трансформированная клетка содержит от 30 до 100 копий эписомной ДНК BPV-1. Таким образом, концентрация вирусной РНК составляет примерно 1/10 от концентрации ее в клетках, трансформированных Ру и SV40 [118]. Клетки, трансформированные BPV-1, содержат два основных вида вирусной РНК длиной 1,1 и 1,2—1,3 kb и минорные РНК длиной 1,6 и 1,8 kb [5] или 1,7, 3,8 и 4,1 kb [118] (по результатам работ двух разных лабораторий). Все виды РНК транскрибируются с одной цепи ДНК, принадлежащей участку, составляющему 69% генома (трансформирующей области). Никаких попыток узнать, являются ли эти РНК ядерными РНК-предшественниками или мРНК, не предпринималось. Транскрипты BPV-1 имеют общий

3'-концевой участок, находящийся вблизи 53-й единицы карты (см. рис. 12.3) [62] около локуса потенциального участка полиаденилирования — ААТААА [33]. 5'-концы главной части (body) транскриптов картируются в следующих областях: 3, 9, 34, 39 и 41 единиц карты [62, 118]. Вблизи 89-й и 1-й единиц карты идентифицированы два потенциальных промоторных участка (ТАТААА) (рис. 12.3). Весьма вероятно, что эти специфические виды вирусных РНК, присутствующие в трансформированных клетках, образуются в результате дифференцированного сплайсинга одного предшественника, транскрипция которого инициируется на одном из двух потенциальных ранних промоторных элементов. Однако предполагаемые лидерные последовательности на 5'-конце вирусной РНК не обнаружены, возможно, из-за их малого размера.

Инфицированные вирусом BPV-1 фибропапилломы (бородавки, продуцирующие вирус) содержат пять дополнительных полиаденилированных видов вирусной РНК длиной 1,7, 3,7, 3,8, 6,7 и 8,0 kb [62]. 5'-концы главных участков молекул РНК длиной 1,7 и 3,8 kb картируются вблизи 71-й и 42-й единицы карты соответственно. Эти вирусные РНК, обнаруживаемые в тканях бородавок, имеют одинаковый 3'-концевой участок, локус которого находится вблизи 90-й единицы карты (рис. 12.3). Существование двух потенциальных сигналов полиаденилирования, идентифицированных по результатам анализа нуклеотидной последовательности ДНК [33], согласуется с локализацией общего 3'-конца.

Итак, из приведенных данных следует, что в геноме BPV-1 имеются по крайней мере два главных транскрипционно активных элемента, в результате чего образуются два набора родственных РНК (возможно, в результате разного сплайсинга). При этом транскрипционный элемент, кодирующий трансформирующую функцию, экспрессируется и в трансформированных клетках, не продуцирующих вирус, и в бородавках, содержащих вирус. Что касается второго транскрипционного элемента, кодирующего белки вирусного капсида, то он экспрессируется только в полностью дифференцированных клетках бородавок.

Экспрессия геномов папилломавирусов человека

Как мы уже говорили, изучение молекулярной биологии этих вирусов и вопроса об их участии в этиологии тех или иных заболеваний человека затруднено отсутствием экспериментальных систем для исследования поведения этого вируса *in vitro*. Считается, что в случае HPV полный цикл продуктивной инфекции имеет место только в полностью дифференцированных клетках плоского эпителия. Какие факторы регулируют экспрессию ви-

вирусного генома в эпидермальных клетках — неизвестно. Никаких природных систем, в которых происходила бы экспрессия генов HPV на уровне, достаточном для биохимического анализа, не найдено. Пытаясь получить модельную систему для изучения репликации HPV, культивируемые эпидермальные клетки человека (кератиноциты) заражали нетипированным HPV, выделенным из подошвенных бородавок [164]. Было показано, что в этих клетках персистируют и реплицируются в виде эписом вирусные ДНК, однако никаких признаков синтеза белков вирусного капсида или вирусных частиц обнаружить не удалось. По-видимому, степень дифференцировки кератиноцитов, культивируемых *in vitro*, недостаточна для поддержания продуктивной вирусной инфекции.

Чтобы создать экспериментальную систему, пригодную для идентификации вирусных мРНК и белков, в клетки мыши [20] и человека (Грин и др., в печати) вводили геномы HPV. При котрансфекции геном тимидинкиназы герпесвируса и каждым из пяти рекомбинантов, содержащих плазмиду pBR322 и один из следующих видов HPV—HPV-1a, HPV-2, HPV-3, HPV-4 и HPV-9 [20],—мышинные клетки, лишённые тимидинкиназы (*tk*⁻), «биохимически трансформировались», приобретая фенотип *tk*⁺. Как показала блот-гибридизация ДНК, практически все клоны *tk*⁺-клеток содержали множественные вставки высокомолекулярной ДНК HPV. Большая часть последовательностей вирусных ДНК HPV в котрансформированных клетках представлена не в виде эписомных ДНК геномного размера. Анализ нескольких клеточных линий, трансформированных HPV-1a и HPV-3, показал, что в разных линиях клеток некоторые копии вирусного генома интегрируются сходным образом. Это приводит к относительно высокому уровню экспрессии четырех или пяти видов цитоплазматической полиаденилированной РНК, содержащей вирусные последовательности. Каждый из этих видов РНК представляет собой гибридную молекулу из РНК HPV и РНК pBR322. Исходя из представлений о молекулярной организации генома HPV-1a, основанных на результатах определения нуклеотидной последовательности ДНК [48], можно предположить, что гибридные РНК HPV-1a/pBR322 — это молекулы разных ранних мРНК (например, E1, E4, E6 и E7), которые начинают считываться с одного общего раннего промотора HPV-1a и кончают считываться на сигнале полиаденилирования pBR322 [20]; появление набора разных РНК обусловлено дифференцированным сплайсингом. Гибридные мРНК образуются вследствие того, что кодирующие области E1, E4, E6 и E7 в рекомбинантах pBR322/HPV-1a отделены от сигнала полиаденилирования, расположенного вблизи 51-й единицы карты. Осуществляется ли трансляция гибридных молекул мРНК HPV-1a/pBR322 с образованием

белков HPV — неизвестно. Отсутствуют также данные об экспрессии поздних генов BPV на уровне мРНК в таких линиях котрансформированных мышинных клеток.

Недавно путем трансфекции рекомбинантами HPV/pSV2neo удалось ввести геном HPV в клеточные линии человека (Грин и др., в печати; pSV2neo — плаزمид, кодирующая бактериальный ген устойчивости к неомицину в форме, которая экспрессируется в клетках млекопитающих [269]). Оказалось, что клоны клеток, отобранные по резистентности к G-18 — антибиотику, приводящему к гибели клеток, в которых не экспрессируется ген устойчивости к неомицину, — содержат рекомбинантные молекулы HPV/pSV2neo, реплицирующиеся в виде эписом и экспрессирующие различные виды вирусной РНК (Грин и др., в печати). Таким образом, эти биохимически трансформированные линии клеток могут оказаться полезными при идентификации ранних белков и предполагаемых трансформирующих белков HPV. Более того, рекомбинанты HPV/pSV2neo, очевидно, могут быть очень хорошими челночными векторами для введения чужеродных генов в клетки человека (Грин и др., в печати).

Нуклеотидная последовательность геномов папилломавирусов

Определение нуклеотидной последовательности ДНК BPV-1 (7945 нуклеотидов), HPV-1a (7815 нуклеотидов) и HPV-6b (7902 нуклеотида) [2, 33, 48, 49, 257a] позволило выявить некоторые интересные особенности молекулярной организации генов папилломавирусов и предполагаемых вирус-специфических белков. По своей организации BPV-1, HPV-1a и HPV-6b очень сходны [49, 257a]. На рис. 12.3 показаны открытые рамки считывания генома BPV-1 (области, потенциально кодирующие белки). У BPV-1 в отличие от SV40 и Рv все открытые рамки считывания (с емкостью кодирования, превышающей 90 аминокислот) расположены на одной и той же цепи ДНК. Вирусные белки, синтезируемые в соответствии с этими открытыми рамками считывания, можно подразделить на две функциональные группы. Ранние белки (E1—E7) локализованы в трансформирующей области, составляющей 69% длины генома, а поздние белки (L1 и L2) — в остальной части генома, составляющей 31% его длины. Предполагаемая трансформирующая область HPV-1 не картировалась с помощью прямого трансформационного анализа. Однако по результатам электронно-микроскопических исследований гетеродуплексов ДНК HPV-1/BPV-1 [45] и по распределению открытых рамок считывания на кодирующей цепи [49] в геноме HPV-1 была идентифицирована область, гомологичная трансформирующей области BPV-1. Отметим, что, как следует из анализа нуклеотидной последовательности ДНК,

E1—E7 представляют собой экзоны в генах белков; однако пока эти белки не идентифицированы ни в одной папилломавирусной природной или экспериментальной системе. Предполагаемые поздние белки L1 и L2 — это, по-видимому, два капсидных белка, обнаруженные в вирионах HPV-1a и BPV-1.

Геномы HPV-1a и BPV-1 имеют несколько специфических гомологичных участков; это показывает нуклеотидная последовательность вирусной ДНК и аминокислотная последовательность вирусных белков, которые должна кодировать эта ДНК [49]. Напротив, между ДНК папилломавирусов BPV-1, HPV-1a и HPV-6b и ДНК полиомавирусов SV40 и Рv не обнаружено заметной гомологии. Отсутствие гомологии и различие в стратегии экспрессии вирусных генов еще раз подтверждают, что полиома- и папилломавирусы составляют два разных семейства.

Аденовирусы

Аденовирусы человека — это одна из лучших экспериментальных систем для изучения молекулярной биологии клеток человека и молекулярных основ клеточной трансформации [94]. В этом разделе мы рассмотрим современные представления об организации и экспрессии генома Ad2, а затем более подробно — молекулярно-биологические аспекты трансформации клеток, индуцируемой аденовирусами [89, 218].

Организация генома аденовирусов

Аденовирус 2 человека (Ad2) и родственный ему аденовирус 5 (Ad5) — это наиболее изученные аденовирусы человека; о них, в основном, и пойдет речь в данном разделе. На рис. 12.4 показаны организация генома вируса Ad2 и локализация главных ранних и поздних мРНК и ранних белков. Вирусный геном длиной 36 kb разбит на 100 единиц. Во время ранних фаз продуктивной инфекции Ad2 транскрибируется шесть независимых областей вирусного генома. Это ранние области E1A, E1B, E2 (E2A и E2B), E3, E4 и поздняя область L1. Каждый из этих ранних транскрипционных элементов использует один промотор и дает сложный спектр сплайсированных мРНК.

Особенно интересны области E1A (единицы карты 1,3—4,5) и E1B (единицы карты 4,6—11,1), поскольку в них закодирована информация об инициации и поддержании трансформации, индуцируемой Ad2. Кроме того, E1A кодирует регуляторные белки, которые активируют экспрессию других ранних генов Ad. В областях E1A и E1B закодировано от пяти до 11 белков (подробнее см. в работе [98]). При экспрессии двух наборов вирусных генов E2A и E2B, которые кодируют какую-то из

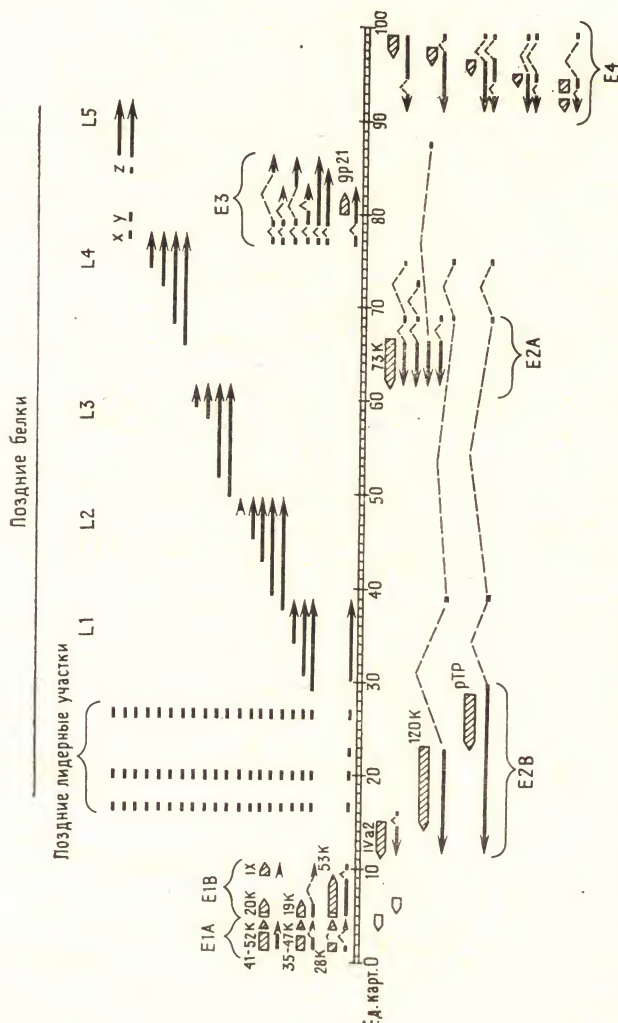


Рис. 12.4. Структура генома Ad2 и соответствующие генные продукты. Черные стрелки — вирусные мРНК; они направлены к 3'-концу. Пунктирные линии — выщепляемые при слайсинге интроны. Заштрихованные стрелки — ранние белки. Соответствие известных ранних белков указанным участкам карты было проведено по оценкам их молекулярных весов. pTP — предшественник терминального белка 80K. (Из [98], с разрешения авторов.)

функций репликации вирусной ДНК, используется один и тот же ранний промотор, расположенный вблизи 75-й единицы карты. Область E2A (единицы карты 66—61) кодирует полифункциональный ДНК-связывающий белок (73К). Соответствующий фосфопротеин удалось получить в высокоочищенном виде. Сегмент E2B кодирует два белка. Один из них является предшественником (80К) терминального белка (pTP; единицы карты 28,9—23,5), второй — ДНК-полимеразой (120 К; единицы карты 24,0—14,2). Эти два белка совместно выполняют функцию инициации репликации аденовирусной ДНК. При экспрессии ранней области E3 (единицы карты 76—86) образуется семь видов мРНК. При этом используется один общий промотор, расположенный вблизи 76-й единицы. Пока известны только два кодируемых E3 белка — гликопротеин 21К (связывающийся с клеточной мембраной) и белок 14К. E4 (единицы карты 99,1—91,3) кодирует сложную группу из семи мРНК; при трансляции *in vitro* удалось обнаружить от шести до 16 различных белков E4. Наконец, во время ранней фазы с области L1 под контролем позднего промотора транскрибируется специфический класс мРНК, который транслируется с образованием двух родственных друг другу белков с мол. массой 52К и 55К [170].

Переход к поздним стадиям экспрессии аденовирусных генов осуществляется при инициации репликации вирусной ДНК; в это время происходят основные изменения в картине транскрипции вирусных генов. Большинство поздних генов располагается в области от 16-й единицы карты, где локализован главный поздний промотор, до 92-й единицы (рис. 12.4). При процессинге из одной молекулы ядерной про-РНК получается 20 поздних мРНК, образующих пять семейств: от L1 до L5 (рис. 12.4). Эти мРНК содержат одинаковый лидерный участок, состоящий из трех частей, которые считываются с сегментов, расположенных вблизи единиц карты 16, 19 и 26. Во время поздних стадий в большом количестве продуцируются поздние мРНК и кодируемые ими вирусные (главным образом структурные) белки.

Организация и экспрессия трансформирующей области и Т-антигенов E1A и E1B вирусов Ad2 и Ad5

Трансформирующая область Ad2 и Ad5 находится в ранней области E1, которая расположена в левой части вирусного генома, составляющей 11—12% его длины. На это указывают результаты а) трансформации клеток с помощью трансфекции рестрикционными фрагментами ДНК, охватывающими область E1 Ad2 и Ad5 (группа С) [91, 293], Ad12 (группа А) [265] и Ad7 (группа В) [54, 260]; б) анализа нуклеотидной последовательности вирусной РНК, экспрессируемой в трансформирован-

ных клеточных линиях [35, 70, 71, 96, 253, 304, 305]. О трансформирующей области E1 Ad2 и Ad5 известно достаточно много: определена нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая трансформирующие гены [17, 85, 294], идентифицированы основные белки, которые кодирует мРНК E1. Все дальнейшее обсуждение относится главным образом к трансформирующим генам Ad2 и Ad5 (вируса, родственного Ad2) и к продуктам этих генов. Анализ нуклеотидной последовательности трансформирующих областей Ad7 и Ad12 показывает, что молекулярная организация аденовирусов групп А, В и С на удивление сходна [53, 148, 273].

Современные представления об организации и экспрессии области E1 Ad2 иллюстрирует рис. 12.5. Транскрипционные элементы E1A и E1B расположены в участках 1,3—4,5 и 4,6—11,1 единиц карты соответственно. При продуктивной инфекции во время ранней фазы с одного промотора транскрибируются две ранние мРНК E1A—13S и 12S; во время поздней фазы с того же промотора транскрибируется 9S-мРНК E1A, но никакого участия в трансформации клетки она не принимает. 13S- и 12S-мРНК E1A образуются из общего ядерного предшественника и различаются размерами интрона, выщепляемого из этого предшественника во время процессинга [217]. В месте сплайсинга эти РНК несут разные 5'-донорные участки и одинаковый 3'-акцепторный. Т-антигены, которые кодируются 13S- и 12S-мРНК Ad2 E1A, имеют мол. массы 32К (289 аминокислот) и 26К (243 аминокислоты) соответственно и содержат одинаковые аминокислотные последовательности на N- и C-концах, как это видно из нуклеотидной последовательности кДНК-копий мРНК E1A [217]. Т-антиген E1A, состоящий из 289 аминокислотных остатков, отличается от антигена из 243 аминокислот наличием участка длиной 46 остатков.

Т-антигены E1A по непонятным причинам очень сложны. Они были идентифицированы несколькими способами: путем бесклеточной трансляции мРНК, очищенных при помощи гибридизации; методом двумерного гель-электрофореза клеточных экстрактов, а также с помощью иммунопреципитации экстракта меченных [³⁵S]-метионином зараженных клеток, осуществленной с использованием антител к пептидам [19, 65, 100, 101, 112, 114, 185, 244, 303]. Любопытно, что в разных лабораториях было обнаружено неодинаковое число Т-антигенов: от одного до трех Т-антигенов с мол. массой 41К—52К, кодируемых 13S-мРНК E1A (мРНК белка из 289 аминокислот), и от одного до трех Т-антигенов с мол. массой 35К—47К, кодируемых 12S-мРНК E1A (мРНК белка из 243 аминокислот) (значения мол. масс получены из данных об электрофоретической подвижности белков в полиакриламидных гелях в присутствии додецил-

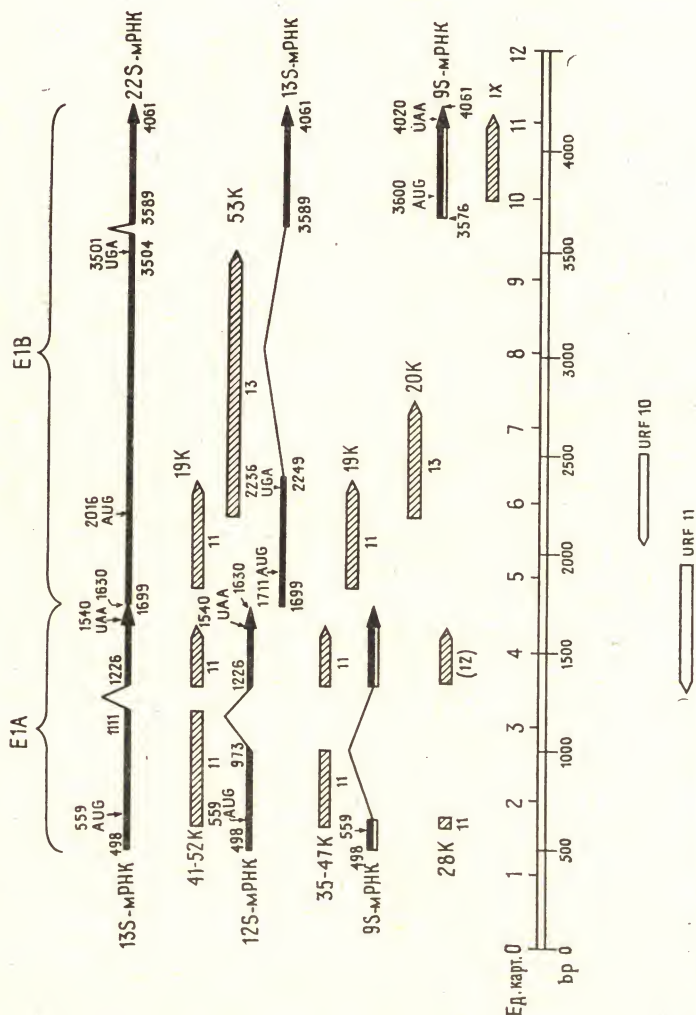


Рис. 12.5. Структура трансформирующих областей генома Ad2 E1A и E1B и соответствующие генные стрелки — вирусные мРНК; рядом с ними указаны константы седиментации (в единицах S). Стрелки направлены к 3'-концу. Штриховые линии — выделенные при слайсинге интроны. Зашированные стрелки — белки E1; рядом с ними указаны значения мол. массы. Номера нуклеотидов относятся к сайтам инициации и терминации транскрипции, донорным и акцепторным сайтам слайсинга и к сайтам инициации и терминации трансляции. f1, f2 и f3 — транскрипционные рамки считывания; URF10 и URF11 — открытые рамки считывания для предполагаемых белков E1 [85]. (Из [98], с разрешения авторов.)

сульфата натрия). По-видимому, такое разнообразие связано с какими-то посттрансляционными модификациями первичных продуктов трансляции. Необычно высокие значения кажущихся мол. масс можно объяснить высоким содержанием в Т-антигенах Е1А кислых аминокислот и пролина.

В области Е1В идентифицировано три главных Т-антигена: белок с мол. массой 53К, кодируемый 22S-мРНК, белок с мол. массой 19К, кодируемый 22S- и 13S-мРНК, и белок с мол. массой 20К, кодируемый неидентифицированной мРНК [17, 65, 84, 97, 100, 112, 114, 138, 169, 171, 185, 241, 255, 298]. Реальная мол. масса Т-антигенов 53К и 19К, рассчитанная исходя из нуклеотидной последовательности ДНК, оказалась равной 54,5К и 20,5К [85]. Обнаружилось, что Т-антиген 20К имеет общие с Т-антигеном 53К участки. Следовательно, он должен транслироваться с той же рамкой считывания, что и Т-антиген 53К. Судя по результатам последних работ, в которых использовались антитела к 16 N-концевым аминокислотным остаткам Т-антигена 53К, N-концевые участки белков 20К и 53К Е1В одинаковы [174]. По-видимому, мРНК, кодирующая Т-антиген 20К, образовалась в результате сплайсинга, отличного от такового в случае мРНК, кодирующей Т-антиген 53К.

Все перечисленные Т-антигены Е1 кодируются *r*-цепью, и соответствующие вирусные мРНК транскрибируются в направлении слева направо. На рис. 12.5 показаны две открытые рамки считывания — URF10 (единицы карты 6,6—5,5) и URF11 (единицы карты 5,1—3,3) — в трансформирующей области Е1 в *l*-цепи [85]. Соответствующие им белки могли бы иметь мол. массу 14К и 23К. Какие функции выполняют эти предполагаемые белки в процессе трансформации — неясно. Недавно с помощью иммунопреципитации с использованием опухолевой сыворотки Ad2 был открыт новый белок — 11К [144]. Судя по результатам задержки трансляции при образовании гибрида с рестрикционным фрагментом *E Bgl*II (единицы карты 0—9,4) предполагаемый ген этого белка должен располагаться в *l*-цепи в трансформирующей области. Возможно, белок 11К образуется с использованием рамки считывания URF10, но чтобы доказать это, нужны дополнительные исследования.

Данные об участии Т-антигенов аденовирусов в трансформации

Трансформирующая область аденовирусов намного сложнее трансформирующих областей SV40 и Ру. Она содержит два транскрипционных элемента Е1А и Е1В, которые кодируют как минимум пять разных Т-антигенов: элемент Е1А — Т-антигены из 243 и 289 аминокислот и элемент Е1В — Т-антигены 19К, 20К и 53К. Недавно были получены чрезвычайно интересные

данные о возможных функциях Т-антигенов. Главный вопрос состоял в том, какие белки, кодируемые E1, нужны для инициации и поддержания трансформации и в чем состоит их роль. Чтобы ответить на этот вопрос, были проведены эксперименты с мутантами, дефектными по функции трансформации, и опыты по трансформации клеток плазмидами, содержащими различные комбинации нормальных и мутантных фрагментов ДНК E1A и E1B. Было показано, что для трансформации нужны по крайней мере три Т-антигена — оба Т-антигена E1A и Т-антиген E1B 19K.

Вывод о том, что три этих Т-антигена принимают участие в трансформации клеток, был сделан исходя из того, что а) все трансформированные аденовирусом клеточные линии содержат и экспрессируют на уровне РНК левый сегмент вирусного генома, размер которого составляет 11% длины генома [71, 75]; б) трансфекция клеток почек новорожденных крысят с помощью левого сегмента, составляющего 8% длины вирусного генома (*HsuI*-G-рестрикционный фрагмент Ad5), индуцирует трансформацию [91]. Клетки, трансформированные этим фрагментом, имели тот же фенотип, что и клетки, трансформированные более длинными фрагментами ДНК или целым вирусом [293]. Эти результаты позволяют предположить, что для трансформации нужна область E1A и левая половина области E1B.

Дополнительные данные об участии Т-антигенов, кодируемых E1A и E1B, в трансформации клеток получены при генетических исследованиях. Были выделены и охарактеризованы дефектные по функции трансформации мутанты с нарушениями в области E1 [72, 76, 90, 113, 121, 141, 267]. Идентифицированы две комплементационные группы *hr*-мутантов Ad5 (мутанты по кругу хозяев); одна группа мутаций (*hrI*) картируется в области E1A, вторая (*hrII*) — в области E1B. *Hr*-мутанты могут реплицироваться в трансформированной Ad5 линии 293 почечных клеток эмбриона человека, которые экспрессируют область E1, но в клеточных линиях HeLa и KB их репликация осуществляется неэффективно. Поскольку обе группы мутантов дефектны по функции трансформации, в трансформации участвуют по крайней мере два гена области E1 [90]. Если и Т-антигены E1A, и Т-антигены E1B нужны для поддержания трансформации, то трансформированные клетки должны сохранять в интактном состоянии те гены, которые кодируют эти белки, и должна осуществляться экспрессия этих генов с образованием соответствующих мРНК и белков. Действительно, сегменты ДНК E1A и E1B присутствуют и экспрессируются на уровне РНК [70, 71, 96, 247] и на уровне белка [97, 98, 103, 185] у четырех охарактеризованных клеточных линий, трансформированных Ad2, — F17, 8617, F4 и T2C4.

**Биологические функции аденовирусных Т-антигенов E1A:
иммортализация и частичная трансформация**

Область E1A кодирует белки, в функцию которых входит инициация трансформации, поддержание клеток в трансформированном состоянии и активация ранних вирусных генов. Фрагмент E *HpaI* Ad5 (единицы карты 0—4,5), который включает только область E1A, может частично трансформировать первичные клетки почек крысят [122]. Эти трансформированные клетки иммортализованы и анеуплоидны, но по своей морфологии и ростовым свойствам сходны с нетрансформированными [122]. Сообщалось, что аналогичной способностью к частичной трансформации упомянутых клеток обладает и фрагмент H *BglII* Ad7 (группа В, единицы карты 0—4,5); биологические свойства частично трансформированных клеток пока охарактеризованы не полностью [54]. Фрагмент H *AccI* (единицы карты 0—4,5; прежнее обозначение *BpaI* H) Ad12 (группа А), несущий только область E1A, частично трансформирует стабильную крысиную клеточную линию 3Y1; по своей опухолеродности, способности расти в обедненной сывороточной среде и делиться в полужидкой среде эти клетки относятся к промежуточному (между трансформированным и нетрансформированным) фенотипу [264]. Тот факт, что экспрессия Т-антигенов E1A Ad12 может приводить к частичной трансформации стабильной линии клеток, позволяет предположить, что область E1A кодирует не только функцию «иммортализации», но и функцию «трансформации»; в этом отношении E1A отличается от гена Рu, который не оказывает никакого воздействия на стабильные линии клеток.

Опыты с использованием трех мутантов Ad, имеющих делеции в области E1A, наводят на мысль, что функции «иммортализации» и «частичной трансформации» кодируют $\frac{2}{3}$ области E1A (от N-конца). Мутант *dl311* Ad5 может трансформировать первичные клетки эмбрионов крыс, хотя он имеет делецию из 58 пар оснований в области 3,56—3,76 единиц карты, в результате чего происходит преждевременная терминация синтеза обоих Т-антигенов E1A [262]. Линия крысиных клеток 3Y1 может переходить в частично трансформированное состояние под действием мутанта *dl313* Ad5, хотя у него отсутствует участок протяженностью 3,7—10,1 единиц карты, т. е. сохранена большая часть E1A, но утрачена вся область E1B [263]. Наконец, мутант Ad2 *dl238*, у которого на С-конце E1A отсутствует последовательность, кодирующая 66 аминокислот, может трансформировать клетки 3Y1 так же эффективно, как и вирус дикого типа [156]. Таким образом, экспрессия $\frac{2}{3}$ области E1A Ad (N-концевой части Т-антигенов) приводит к иммортализации первичных

фибробластов и частичной трансформации стабильной клеточной линии.

Ясно, что функции E1A прямо или косвенно нужны для поддержания трансформации; на это указывают результаты опытов с использованием *hr*-мутантов Ad5, имеющих нарушения в области E1A, в результате которых эти мутанты становятся чувствительными к понижению температуры (*cs*-мутанты). *Cs*-мутанты могут трансформировать клетки при температуре 37—38,5°C, но не при температуре 32—32,5°; при этом клетки, трансформированные при пермиссивных температурах, утрачивают некоторые сопряженные с трансформацией свойства при понижении температуры до непермиссивных значений [8, 121]. *Cs*-фенотип *hr1*-мутантов зависит от клетки-хозяина. Первичные клетки почек крысят при пермиссивных температурах трансформируются полуабортивно [245], а первичные клетки эмбрионов крыс [121] и стабильная крысиная клеточная линия [8] — полностью. При низких непермиссивных температурах все три типа клеток оказываются резистентными по отношению к трансформации мутантами *hr1*. Результаты последних работ показывают, что чувствительной к понижению температуры является функция трансформации Т-антигена, кодируемого 12S-мРНК [193].

**Биохимические функции аденовирусных Т-антигенов E1A:
активация ранних вирусных генов и активация
и репрессия клеточных генов**

При исследовании *hr*- и делеционных мутантов, дефектных по экспрессии E1A, были получены чрезвычайно интересные данные относительно биохимических функций Т-антигенов E1A. Исследование синтеза РНК в клетках, зараженных этими мутантами, позволило получить первые данные о том, что продукт гена E1A активирует экспрессию других ранних вирусных генов — E1B, E2, E3 и E4 [10, 140]. Продукт гена E1A, по-видимому, выполняет регуляторную функцию на уровне транскрипции [202], хотя результаты некоторых экспериментов говорят о том, что он может также участвовать в стабилизации ранних вирусных РНК [143, 216]. Функцию регуляции кодирует 13S-мРНК E1A, поскольку мутант Ad2 *pm975*, синтезирующий дефектную 12S-мРНК, может активировать экспрессию вирусных ранних генов [194], а *hr1*, дефектный по 13S-мРНК, — нет [140, 234]. Мутанты с нарушениями в 13S-мРНК, как правило, дефектны по синтезу вирусной ДНК. Это обусловлено главным образом ограничением экспрессии ранних генов, продукты которых необходимы для репликации вирусной ДНК (например, генов E2A и E2B). Механизм действия регуляторного белка, кодируемого 13S-мРНК E1A, неизвестен. Опыты с использованием

белковых ингибиторов [143, 202] позволяют предположить, что продукт гена E1A блокирует некий клеточный репрессор, но прямые данные на этот счет отсутствуют.

Интересно также, что экспрессия гена E1A приводила к активации транскрипции клеточных генов, в том числе хромосомного гена, кодирующего белок теплового шока 70K [203], и человеческого гена β -глобина, введенного в культивируемые клетки человека с помощью плазмиды [107, 287]. Клеточное фракционирование и иммунофлуоресцентная микроскопия с антителами против пептидов показали, что Т-антигены E1A локализованы в клеточном ядре [67, 175, 243] и, по-видимому, связаны с ядерным матриксом [67]; это согласуется с предположением об их участии в процессе экспрессии генов. На рис. 12.6 представлены результаты иммунофлуоресцентной микроскопии клеток на ранней стадии заражения Ad12; использовались антитела к С-концу Т-антигенов E1A Ad12. Четко видно специфическое окрашивание клеточного ядра.

Аденовирусная 13S-мРНК E1A кодирует функцию, необходимую для клеточной трансформации, не совпадающую с функцией активации вирусных ранних генов

Как мы уже говорили, 13S-мРНК E1A кодирует некую регуляторную функцию, которая приводит к активации экспрессии других ранних вирусных генов. В связи с этим важно выяснить, выполняет ли ген E1A такую же функцию в процессе трансформации. В последних работах с использованием мутантов по генам E1 получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что а) можно разграничить функцию E1A по активации ранних генов и его функцию в трансформации; б) 13S-мРНК E1A кодирует специфическую функцию в процессе трансформации.

Мутант Ad5 *hr440* содержит нарушения в сайте 2,72 единицы карты области E1, т. е. в пятом и шестом нуклеотидах, начиная с 5'-конца от места сплайсинга 12S-мРНК. Эта модификация приводит к дефекту в сплайсинге 12S-мРНК и к появлению в 13S-мРНК *amber*-кодона [267]. В результате мутант *hr440* дефектен по экспрессии 12S-мРНК E1A, а кроме того, кодирует неполный полипептид, транслирующийся с мутантной 13S-мРНК. При этом мутант *hr440* синтезирует нормальное количество мРНК E1B и E4 и продуцирует какое-то количество мРНК E2 и E3. Тем не менее, несмотря на нормальный уровень экспрессии E1B, *hr440* не способен трансформировать клетки [267]. В другой работе показано, что трансфекция первичных клеток почек крысят и 3Y1 плазмидами, содержащими ген E1B под контролем

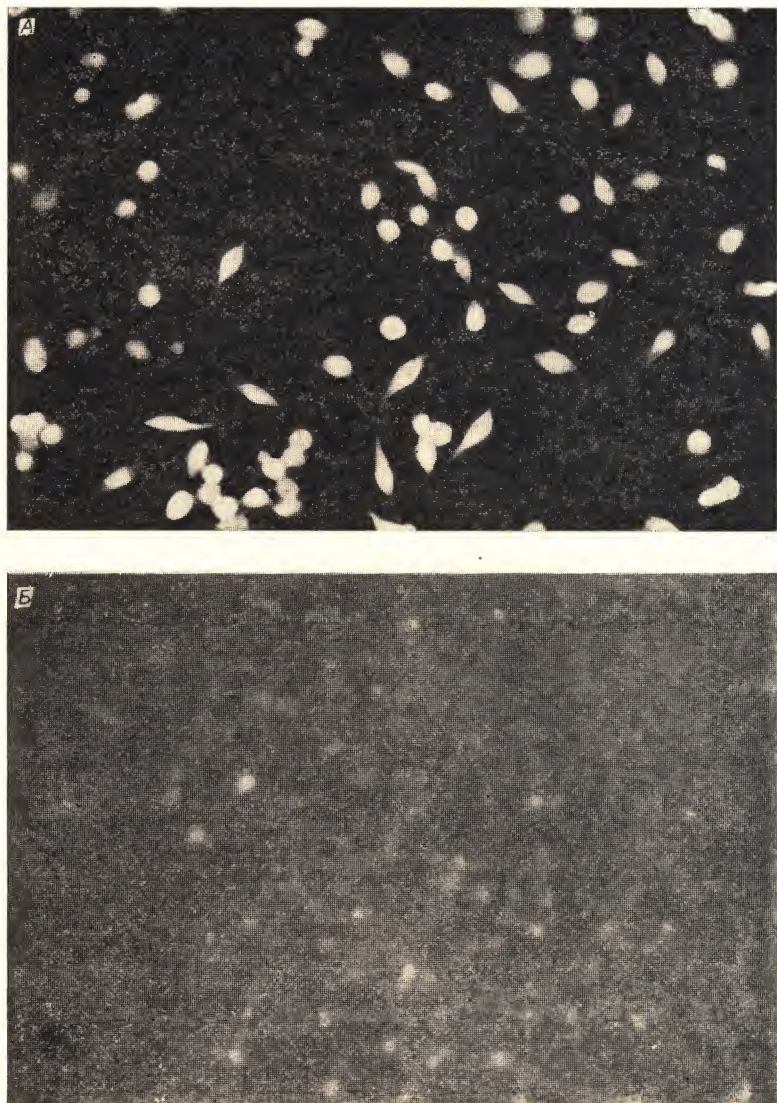


Рис. 12.6. Субклеточная локализация Т-антигенов E1A Ad12 в ядре человеческих клеток КВ на ранней стадии заражения и демонстрация специфичности антител по результатам иммунофлуоресцентной микроскопии с применением антител к пептидам. Клетки фиксировали через 24 ч после заражения в присутствии цитозинарабинозида и проводили не прямое иммунофлуоресцентное окрашивание (А) антителами к пептиду 204 (пептид из 16 аминокислот, соответствующий С-концевому сегменту Т-антигена E1A Ad12) и (Б) антителами к пептиду 204 после инкубации с пептидом 204. (Из [175], с разрешения авторов.)

раннего промотора SV40, индуцирует экспрессию области E1B, но не приводит к трансформации клеток [291]. В случае же ко-трансфекции с плазмидой, содержащей область E1A, трансформация происходит. Все эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессии E1B недостаточно для трансформации; необходимо наличие некой другой, отличной от активации гена E1B функции E1A.

Указания на то, что для трансформации нужен продукт гена 13S-мРНК, получены в работах с использованием трех дефектных по функции трансформации мутантов E1 — *hrI*, *in500* и *pR7*. Эти мутанты кодируют нормальные генные продукты 12S-мРНК, но неполные генные продукты 13S-мРНК и индуцируют образование нормального количества мРНК E1B. Мутант *hrI* имеет делецию размером в один нуклеотид в точке 2,93 единиц карты и это приводит к синтезу неполного Т-антигена, транслируемого с 13S-мРНК E1A, и нормального Т-антигена, транслируемого с 12S-мРНК E1A [234]. Мутант *hrI* при 37°C вызывает полубортивную трансформацию первичных клеток почек крысят; клетки не могут расти в полужидкой среде и обладают слабой опухолеродностью при введении их мышам *nude* [90, 245]. В abortивно трансформированных культурах первичных клеток почек крысят происходит нормальная экспрессия Т-антигенов E1B 53K и 19K. Инсерционный мутант Ad5 *in500* получен путем введения октануклеотида в сайт 2,85 единиц карты, т. е. в область E1A, кодирующую 13S-мРНК. Этот мутант синтезирует модифицированную 13S-мРНК, с которой транслируется неполный Т-антиген с модифицированной С-концевой аминокислотной последовательностью, и обычную 12S-мРНК (октануклеотидная вставка расположена в области интрона гена 12S-мРНК, которая удаляется при сплайсинге) [28]. Мутант *in500* теряет способность к трансформации первичных клеток почек крысят, однако индуцирует нормальный синтез мРНК E1B и E3, а кроме того, синтез какого-то количества мРНК E2 и E4 [28]. Плазмида *pR7* содержит всю область E1 Ad12 с делецией нуклеотида 1005 (2,9 единиц карты) [18]. Такая мутация приводит к сдвигу рамки в кодирующей области 13S-мРНК E1A, с которой вследствие этого транслируется неполный Т-антиген, но не оказывает влияния на кодирующую область 12S-мРНК E1A [18]. Плазмида *pR7* не способна к трансформации первичных клеток почек крысят, но индуцирует экспрессию нормального количества мРНК E1B. Результаты трех названных работ позволяют предположить, что за активацию вирусных ранних генов и индукцию трансформаций клеток отвечают два разных белковых домена или два разных посттрансляционных продукта, кодируемые 13S-мРНК E1A.

**Для трансформации нужен генный продукт аденовирусной
12S-мРНК E1A**

К изучению вопроса об участии в трансформации Т-антигена (антигенов), кодируемого 12S-мРНК E1A, обратились совсем недавно. Были сконструированы два мутанта Ad2—*pm975* и *dl1231*, в которых имеются нарушения, влияющие на сплайсинг 12S-мРНК E1A Ad2, но не на сплайсинг 13S-мРНК E1A Ad2. Оказалось, что оба мутанта дефектны по функции трансформации; зараженные ими клетки имеют фенотип, характерный для частично трансформированного состояния [125, 193]. Таким образом, по крайней мере два продукта гена E1A участвуют в индуцируемой аденовирусом трансформации, причем один кодируется 13S-мРНК, а другой — 12S-мРНК.

**Для повышения опухолеродности
и репрессии активности гена клетки-хозяина,
кодирующего главный антиген гистосовместимости,
необходим генный продукт 13S-мРНК E1A аденовируса 12**

Крысиные клетки, трансформированные Ad12, высокоонкогенны для новорожденных сингенных крыс в отличие от клеток, трансформированных Ad2 и Ad5. Последние данные показывают, что высокая опухолеродность клеток, трансформированных Ad12, отчасти обусловлена продуктом гена 13S-мРНК E1A. В клетках, трансформированных Ad12, «выключен» синтез двух клеточных белков с мол. массой 32К и 45К, которые экспрессируются в клетках, трансформированных Ad5, и в нетрансформированных клетках [256]. Белок 45К представляет собой тяжелую цепь трансплантационного антигена крысиного главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I [256]. Отсутствие этого белка и высокая опухолеродность коррелируют с экспрессией последовательностей E1A Ad12; это следует из работ по трансформации клеток плазмидами, содержащими различные комбинации генов E1A и E1B вирусов Ad12 и Ad5 [12, 256]. Трансформированные крысиные клетки, в которых происходила экспрессия генов E1A Ad5, легко разрушались *in vitro* Тс-лимфоцитами, направленными против антигенов МНС класса I, тогда как трансформированные клетки, в которых наблюдалась экспрессия генов E1A Ad12, были существенно более резистентными [12]. Это подтверждает гипотезу, которая объясняет онкогенность клеток, трансформированных Ad12, для иммунокомпетентных сингенных крыс тем, что у них подавлен синтез антигенов класса I и поэтому у них отсутствует Т-клеточный ответ на эти белки.

Продукт гена Ad12, ответственный за подавление синтеза антигенов класса I, кодируется 13S-мРНК E1A. Это следует из

результатов работ с клетками, трансформированными мутантами Ad12 с нарушениями в кодирующей области 13S-мРНК E1A [12]. Супрессия идет на уровне синтеза клеточной мРНК, которая кодирует МНС-антиген [256]. 13S-мРНК E1A Ad12, кроме функции супрессии синтеза МНС-антигена, кодирует функцию активации экспрессии E1B [16, 18]. По-видимому, за эти функции отвечают разные домены Т-антигена 13S-мРНК, поскольку в клетках, трансформированных мутантной плазмидой SVR7 (которая содержит область 13S-РНК с моонуклеотидной делецией), активируется экспрессия E1B, хотя в них не подавлен синтез антигенов класса I.

Интересно также, что если трансформировать клетки гибридными плазмидами, кодирующими оба Т-антигена 13S-мРНК E1A (и Ad5, и Ad12), то синтезируется нормальное количество МНС-антигенов. Это означает, что продукт гена 13S-мРНК Ad5 доминантен по отношению к продукту гена 13S-мРНК Ad12. Возможно, продукты этих генов конкурируют за взаимодействие с одним и тем же клеточным регуляторным фактором. Чтобы выяснить механизм регуляции экспрессии генов у эукариот, очень важно понять, как продукты генов 13S-мРНК Ad осуществляют активацию или репрессию клеточных генов.

Участие аденовирусных Т-антигенов E1A в репликации вирусов

Хотя в трансформации клеток принимают участие генные продукты 12S- и 13S-мРНК E1A, для нормальной продуктивной инфекции клеток человека в культуре, по-видимому, нужен только продукт гена 13S. Мутанты Ad2 *dl231* и *pm975*, дефектные по 12S-мРНК E1A, нормально растут в культурах клеток человека при обычных условиях [125, 193]. Однако при блоке пролиферации в клетках человека мутант *pm975* не реплицируется, тогда как вирус дикого типа реплицируется. Это означает, что 12S-мРНК E1A кодирует функции, которые в естественных условиях нужны для вирусной репликации в нереплицирующихся клетках, таких как клетки эпителия дыхательных путей [193].

Роль аденовирусных Т-антигенов E1B в трансформации клеток

Участие продуктов генов E1B в трансформации клеток подтверждается как результатами работ с дефектными по функции трансформации мутантами, так и экспериментами по трансформации с помощью ДНК. Роль большого Т-антигена E1B (белка 53K) в процессе трансформации неясна. У дефектных по трансформации мутантов в группе *hrII* обычно нарушен синтез

Т-антигена 53К [165]. Вирусные частицы этих мутантов не способны трансформировать клетки [90], но при трансфекции вирусной ДНК трансформация осуществляется с такой же эффективностью, как и в случае вирусов дикого типа [242]. В чем причина такого различия между вирусом *hrII* и вирусной ДНК *hrII* — пока неясно. Была выдвинута гипотеза, что интеграция вирусной ДНК из родительского вируса, заражающего клетку (при низкой множественности заражения), осуществляется лишь при наличии некой функции большого Т-антигена E1B, тогда как при интеграции трансформирующей вирусной ДНК (т. е. при наличии большого числа копий вирусной ДНК) используются механизмы клетки-хозяина [89, 242].

Способность мутантной ДНК *hrII* трансформировать клетки согласуется с данными о том, что левый сегмент ДНК Ad5, составляющий 8% длины всего генома, может индуцировать трансформированный фенотип точно так же, как интактный вирус [91, 293]. Таким образом, для трансформации *in vitro* интактный большой Т-антиген E1B, по-видимому, не нужен. Однако неизвестно, синтезируется ли (и если синтезируется, то функционирует ли) в клетках, трансформированных этим сегментом ДНК, N-концевой фрагмент большого Т-антигена E1B. Более того, пока не изучен вопрос о возможном участии в процессе трансформации Т-антигена E1B 20K.

Хотя большой Т-антиген E1B не нужен для трансформации клеток *in vitro*, последние работы показывают, что продукт этого гена может влиять на опухолеродность Ad-трансформированных клеток в отношении мышей *nude*. Первичные клетки почек крысят, трансформированные аденовирусами группы А, высокоопухолеродны для таких мышей, тогда как клетки, трансформированные вирусами группы С, — нет. Ван ден Елсен и др. [292] создали гибридные (группа А/группа С) E1-плазмиды, содержащие интактный ген E1A одной группы и интактный ген E1B другой. Первичные клетки почек крысят, трансформированные гибридными плазмидами (E1A группы С)/(E1B группы А), оказались высокоонкогенными, в то время как клетки, трансформированные гибридными плазмидами (E1A группы А)/(E1B группы С), — слабоонкогенными. Таким образом, различия в онкогенности клеток, трансформированных вирусами группы А и группы С, для мышей *nud* обусловлены, по-видимому, различиями в продуктах гена E1B. Чтобы дифференцировать роль большого и малого Т-антигенов E1B, Бернардс и др. [11] сконструировали гибридные плазмиды, кодирующие различные комбинации малых и больших Т-антигенов E1B групп А и С. Оказалось, что опухолеродность трансформированных клеток определяется большим Т-антигеном, т. е. белком E1B-53K. Таким образом, для высокой опухолеродности трансформированных клеток ну-

жен, по-видимому, функциональный большой Т-антиген Е1В Ad12. Ранее, однако, было показано, что фрагмент G *Hind*III Ad12 (единицы карты 0—6,8), который не может кодировать интактный большой Т-антиген Е1В, обладает способностью трансформировать крысиные клетки, и эти клетки высокоонкогенны для новорожденных крысят [264, 265]. Более того, как уже говорилось, 13S-мРНК Е1А Ad12 кодирует некую функцию, которая подавляет синтез МНС-антигенов класса I, и, возможно, именно этим определяется высокая онкогенность крысиных клеток, трансформированных Ad12, в отношении новорожденных крысят. Следовательно, онкогенность трансформированных аденовирусами клеток в отношении иммунодефицитных мышей *nude* и иммунокомпетентных новорожденных крысят определяется разными продуктами генов Е1.

Т-антиген Е1В-53К присутствует и в ядре, и в цитоплазме инфицированных и трансформированных клеток; об этом свидетельствуют результаты работ по биохимическому фракционированию [97, 243] и иммунофлуоресцентной микроскопии с применением антител к пептидам [303]. Иммунопреципитаты, содержащие Т-антиген Е1В-53К Ad5, обладают протеинкиназной активностью [21, 166]. Неизвестно, однако, присуще ли это свойство самому Т-антигену Е1В-52К или какому-то связанному с ним белку клетки-хозяина.

Большое значение для трансформации клеток имеет Т-антиген Е1В-19К. Хиннадураи [34] выделил несколько дефектных по трансформации крупнобляшечных мутантов, картирование которых осуществляли методом спасения маркера в области Е1В. У двух таких мутантов, *lp3* и *lp5*, мутации были локализованы (если судить по нуклеотидной последовательности ДНК) в N-концевой области Т-антигена Е1В-19К [34]. Таким образом, N-концевой домен белка Е1В-19К играет важную роль в процессе трансформации.

Цитоидные (*cyt*) мутанты дефектны по трансформации и вызывают интенсивное разрушение продуктивно инфицированных клеток. Сравнительно недавно было показано, что *cyt*-мутации Ad2 и Ad12 локализованы в кодирующей области Т-антигена 19К [227a]. Этот результат является еще одним доказательством того, что Т-антиген Е1В-19К играет важную роль в трансформации клеток. Имеются также данные о том, что Т-антиген 19К принимает участие в защите клеточной и внутриклеточной вирусной ДНК от нуклеаз во время поздних стадий продуктивной инфекции (Subramanian et al., в печати).

Судя по результатам иммунофлуоресцентной микроскопии с применением антител к С-концевой части Т-антигена 19К, этот антиген присутствует в цитоплазме и ядре инфицированных клеток (рис. 12.7) (Symington, Green, Brackman, Thornton, в

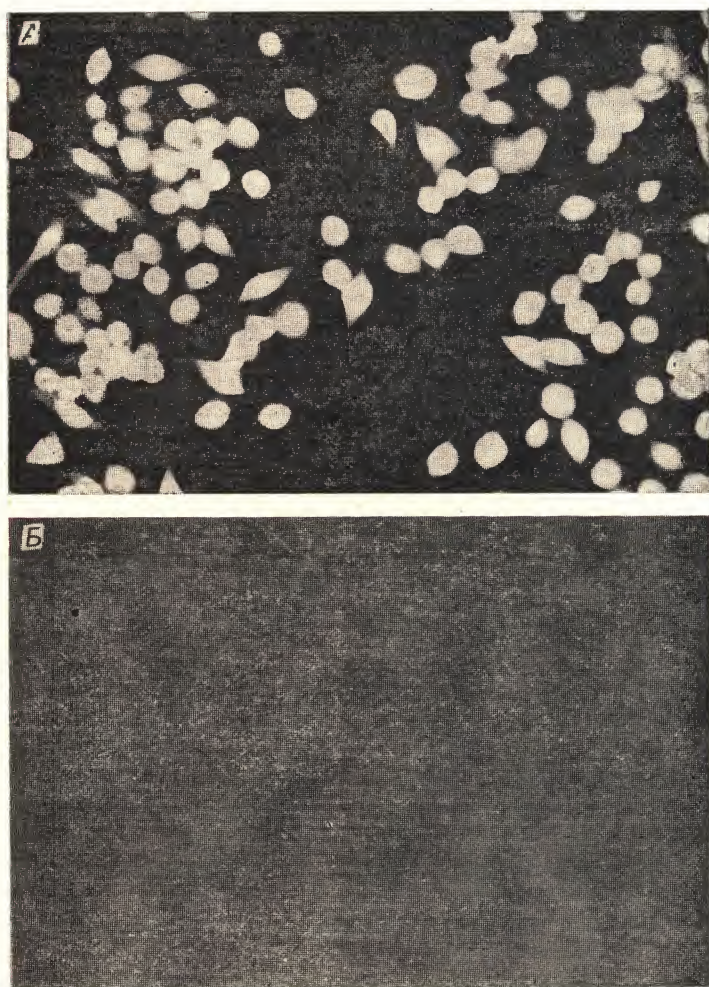


Рис. 12.7. Субклеточная локализация Т-антигена E1B-19K Ad2 в цитоплазме и ядре человеческих клеток KB на ранней стадии заражения и демонстрация специфичности антител по результатам иммунофлуоресцентной микроскопии с применением антител к пептидам. Клетки фиксировали через 8 ч после заражения и проводили непрямо-иммунофлуоресцентное окрашивание (А) антителами к пептиду 7 (пептид из 16 аминокислот, соответствующий С-концевому сегменту Т-антигена E1B-19K Ad2) и (Б) антителами к пептиду 7 после инкубации с пептидом 7. (Syminton, Green, Brackmann, Thornton, в печати.)

печати). По данным иммуноэлектронной микроскопии клеток, трансформированных Ad2, Т-антиген Е1В-19К локализован в цитоплазматических мембранных структурах на периферии ядра (Р. Nakane, М. Green, в печати). О присутствии Т-антигена Е1В-19К в мембранной фракции свидетельствуют и биохимические данные [215]. Таким образом, Т-антиген Е1В-19К, по-видимому, аналогичен среднему Т-антигену Р_у, который обнаруживается и в мембранных структурах цитоплазмы, и в ядре [109]. Т-антиген Е1В-19К, очевидно, играет двоякую роль; кроме участия в трансформации клеток и опухолеродности, он защищает новосинтезированную вирусную ДНК и ДНК клетки-хозяина [272b].

Ясно, что для понимания механизма трансформации клеток, индуцируемого аденовирусами, необходимо детально исследовать функции Т-антигенов Е1А и Е1В. Т-антигены Е1А предоставляют нам уникальную возможность для изучения регуляции экспрессии генов у эукариот. Важным шагом в исследовании функций генов Е1 могли бы стать биологические и биохимические работы с очищенными Т-антигенами Е1. К сожалению, в инфицированных и трансформированных клетках этот белок присутствует в незначительных количествах. Для достижения дальнейшего прогресса в этой области необходимо получить Т-антигены в очищенном виде, а для этого необходимы такие эукариотические клетки, в которых они амплифицированы, или созданные с помощью генетической инженерии прокариотические клетки — сверхпродуценты Т-антигенов.

Герпесвирусы

О молекулярной биологии процесса трансформации клеток с помощью герпесвирусов известно сравнительно мало. Ни в одной работе не удалось показать, что какой-нибудь из герпесвирусов кодирует трансформирующий ген, функция которого нужна для поддержания трансформированного состояния. Возможно, механизм онкогенеза при участии герпесвирусов в корне отличается от механизма онкогенеза в случае SV40, Р_у, Ad и тех ретровирусов, которые кодируют онкогены.

Трансформация с помощью альфа-герпесвирусов HSV-1 и HSV-2

Способность специфических рестрикционных фрагментов ДНК HSV-1 и HSV-2 к трансформации *in vitro* была установлена несколькими исследователями (более подробно см. в работе [150]). Очаговая трансформация эмбриональных клеток хомячка в обедненной сывороткой среде в результате трансфекции фрагментом F *Xba*I (23 kb) HSV-1, локализованным в области 30—45 единиц карты, была впервые описана Камачо и Спear

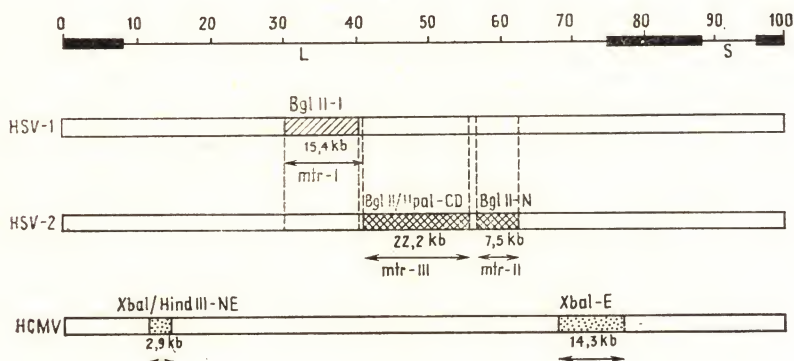


Рис. 12.8. Карта рестрикционных фрагментов ДНК HSV-1, HSV-2 и HCMV, обладающих трансформирующей активностью. (С изменениями из [116], с разрешения авторов; положения трансформирующих фрагментов HCMV взяты из работ [201, 37].)

[27]. Эти трансформированные клетки могли расти в полужидкой среде. Рейес и др. [233] трансформировали эмбриональные клетки хомячка и мыши Balb/3T3 фрагментом I *Bgl*II HSV-1 (15,4 kb), расположенным в области 31—42 единиц карты. Этот сегмент вирусного генома называют *морфологической трансформирующей областью I* (*mtrI* на рис. 12.8). Сегмент *mtrI* кодирует гликопротеин HSV-1 (gAgB) и ДНК-связывающий белок; здесь же находится и сайт инициации репликации *ori* вирусной ДНК. Однако попытки обнаружить последовательности вирусных ДНК в клетках, трансформированных фрагментами ДНК HSV-1, пока не увенчались успехом [233, 116].

Сообщалось, что в случае HSV-2 трансформировать клетки могут два разных рестрикционных фрагмента ДНК. Фрагмент N *Bgl*II (7,5 kb), расположенный в области 58—63 единиц карты (*mtrII* на рис. 12.8), трансформирует эмбриональные клетки крыс и хомячков, а также клетки мышей Balb/3T3 и NIH/3T3 [77, 233]. Трансформированные клетки были отобраны по способности расти в обедненной сыворотке и в полужидкой среде. Второй фрагмент ДНК HSV-2, фрагмент CD *Bgl*II/*Hpa*I (22 kb), расположенный в области 42—57 единиц карты (*mtrIII* на рис. 12.8), трансформирует эмбриональные клетки хомячка. Это было установлено методом пассажей: клетки повторно культивировали, чтобы отобрать иммортализованные трансформанты [134]. Недавно фрагмент *mtrIII* удалось разделить на два функциональных субфрагмента, кодирующие две последовательные ступени трансформации, — иммортализацию и превращение иммортализованных клеток в опухолеродные [135]. Ни один из трансформирующих фрагментов HSV-2 (*mtrII*, *mtrIII*) не гомо-

логичен трансформирующему фрагменту HSV-1 (*mtrI*). Это удивительно, если учесть, что HSV-1 и HSV-2 структурно и функционально колинеарны. По-видимому, механизм трансформации клеток у этих двух вирусов различен. Интересно, что трансформирующие фрагменты HSV-1 и HSV-2 не содержат ни одного из ранних генов альфа-герпесвирусов. Это еще раз подтверждает гипотезу о том, что механизм трансформации клеток с помощью герпесвирусов радикально отличается от механизмов трансформации с помощью Рv, SV40 и Ad, у которых для инициации трансформации и ее сохранения нужны функции ранних генов. Хотя трансформирующие фрагменты HSV-2, видимо, необходимы для инициации трансформации, данных о наличии в трансформированной клетке специфических последовательностей вирусной ДНК нет.

Отсутствие вирусных генов в клетках, трансформированных HSV-2, приводит к выводу, что вирусная ДНК не нужна для поддержания трансформированного фенотипа. Однако, если учесть, что возможности современных методов весьма ограничены, трудно исключить присутствие небольшого сегмента вирусной ДНК длиной 1—3 kb, который мог бы кодировать трансформирующую функцию. Для объяснения механизма трансформации клеток вирусами HSV-1 и HSV2 был предложен упоминавшийся механизм «порази-и-беги» [78]. Так, трансформация может быть косвенным следствием мутагенной активности вирусного гена или может произойти в результате активации какого-то клеточного онкогена. В связи с этим интересно заметить, что HSV-специфическая рибонуклеотид-редуктаза кодируется участком вирусного генома, частично перекрывающимся с *mtrII* и *mtrIII* [126]. Возможно, кратковременная экспрессия гена этого вирусного фермента оказывает мутагенное действие на клеточную ДНК, создавая дисбаланс некоторых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов во внутриклеточном пуле и, следовательно, нарушая точность репликации ДНК. Совсем недавно было показано, что фрагмент ДНК HSV-2 из 700 пар оснований способен к трансформации клеток (McDougall, Galloway, личное сообщение). Этот небольшой трансформирующий фрагмент имеет структуру «стебель—петля», аналогичную структуре IS-элемента. Эти данные также подтверждают, что ДНК HSV-2 осуществляет трансформацию с помощью уникального механизма, в котором не участвуют классические вирусные трансформирующие гены.

Трансформация с помощью альфа-герпесвируса EHV-1

Герпесвирус лошадей типа 1 (EHV-1), другой член подсемейства альфа-герпесвирусов, может трансформировать эмбрио-

нальные клетки хомячка *in vitro*. Трансформацию клеток вирусом ENV-1 осуществляли двумя способами. В первом случае эмбриональные клетки хомячка заражали с помощью УФ-облученного ENV-1 и отделяли скопления клеток с измененной морфологией [238]. Клеточные линии из этих скоплений образовывали колонии на мягком агаре и индуцировали опухоли у новорожденных хомячков и у взрослых сингенных хомячков. В разных линиях трансформированных клеток и опухолях, индуцированных у хомячков при введении им трансформированных клеток, обнаруживали от одной до четырех копий сегментов вирусного генома, составляющих 2—20% его длины. Во втором случае первичные эмбриональные клетки хомячка трансформировали вирусными штаммами, обогащенными дефектными частями ENV-1 [237]. Трансформированные клетки сохраняли от 23 до 45 копий целого вирусного генома, а опухоли, индуцированные трансформированными клетками, содержали от двух до четырех копий сегментов вирусного генома, составляющих 40—60% его длины.

Три клеточные линии, иммортализованные с помощью трансформации УФ-облученным ENV-1, исследовали методом блот-гибридизации ДНК [236, 239]. Участки генома ENV-1 были встроены во множество мест генома клетки-хозяина. При этом во всех линиях трансформированных клеток присутствовала по крайней мере одна копия участка генома, расположенного в области 32—38 единиц карты. Указанная последовательность (но не другие участки вирусной ДНК) обнаруживалась на протяжении 100 клеточных пассажей. Эти данные свидетельствуют о возможном существовании интегрируемых специфических вирусных последовательностей, связанных с сохранением онкогенного фенотипа у клеток, трансформированных с помощью ENV-1.

Трансформация с помощью бета-герпесвируса HCMV

Способностью к трансформации обладают две области генома цитомегаловируса человека (HCMV). Это следует из результатов опытов по трансфекции клонированных рестрикционных фрагментов. Авторам работы [201] удалось трансформировать клетки NIH/3T3 фрагментом NE *XbaI/HindIII* (2,9 kb), который находится в области 12—14 единиц карты в молекуле ДНК прототипного штамма HCMV (рис. 12.8). Однако в трансформированных клетках не было обнаружено последовательностей вирусной ДНК [201]. Используя метод пассажей клеток для отбора трансформированных клонов, Клантон и др. [37] трансформировали эмбриональные клетки хомячка другим фрагментом ДНК HCMV—E *XbaI* (14,3 kb), расположенным в области

68—77 единиц карты (рис. 12.8). Этот фрагмент генома HCMV (штамм Таун) частично гомологичен участку *mtrIII* HSV-2 [37] (рис. 12.8). Как следует из приведенных данных HCMV сходен с HSV-2 в том отношении, что каждый из них имеет две трансформирующие области.

Следует отметить, что в геноме HCMV с помощью экспериментов по гибридизации были обнаружены нуклеотидные последовательности, родственные онкогену *v-myc* вируса миелобластома птиц и протоонкогену человека *c-myc* [82, 270]. С ДНК HCMV гибридизовался 5'-концевой участок кодирующей последовательности *myc*. Последовательности, гомологичные *myc*, были обнаружены в нескольких областях генома HCMV [82]. Их происхождение и функции неизвестны. Интересно, что область E1A у аденовирусов, которая содержит ген, кодирующий функцию иммортализации, также имеет родственные *myc* последовательности [226].

Трансформация с помощью гамма-герпесвируса EBV

EBV и обезьяньи герпервирусы — это представители подсемейства гамма-герпесвирусов. Их репликация осуществляется в В- и Т-лимфоцитах. Состояние вирусной ДНК в этих клетках иное, чем в клетках, трансформированных вирусами подсемейств альфа и бета. Геном EBV в вирусной частице представлен линейной двухцепочечной ДНК длиной 170 kb. В опухолевых тканях и линиях трансформированных клеток, взятых из лимфом Беркита и карцином носоглотки, обнаруживают множество копий кольцевых эписомных молекул ДНК, представляющих собой полную молекулу ДНК EBV. Однако не исключено, что некоторые копии вирусной ДНК интегрированы с клеточным геномом, особенно если учесть, как высока концентрация эписомной формы. Действительно, гибридизация *in situ* с использованием меченых рестрикционных фрагментов указывает на то, что некоторые молекулы вирусной ДНК, по-видимому, встраиваются в хромосому в определенном месте [119].

В трансформированных с помощью EBV В-лимфоцитах и лимфобластах лимфомы Беркита в культуре осуществляется интенсивная транскрипция генома EBV (более подробно см. в работе [147]). Около 10% вирусного генома экспрессируется в виде молекул полиаденилированной вирусной РНК, которые обнаруживаются в полисомах; вероятно, это вирусные мРНК, на которых происходит трансляция белков. Менее интенсивная транскрипция осуществляется в биопсийных пробах опухолей Беркита, и РНК-транскрипты картированы в двух областях вирусного генома.

Хотя мы уже многое знаем о структуре и организации вирус-

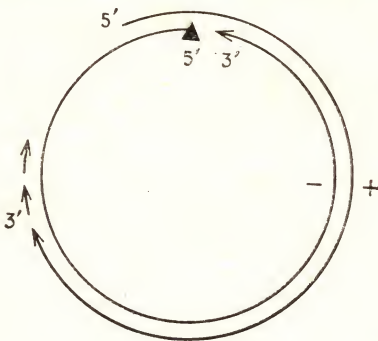
ного генома и об экспрессии генов EBV на уровне РНК и белков [147], данные о трансформирующих генах и белках EBV пока отсутствуют. Результаты последних исследований свидетельствуют о том, что EBV индуцирует образование лимфомы Беркита путем активации клеточного гена *тус*. Характерной особенностью клеток лимфомы Беркита является транслокация сегмента хромосомы 8 в одну из хромосом 14, 2 или 22, в место расположения иммуноглобулиновых генов. Ген человека *с-тус* локализуется в месте цитогенетического разрыва [46, 199, 282], и в нескольких случаях лимфомы Беркита отмечались перестройки в гене *с-тус* (более подробно см. в работе [149]). Высказывалось предположение, что определенную роль в онкогенном действии играет повышение уровня экспрессии гена *с-тус* или синтез модифицированного (вследствие мутации или перестройки гена) белка *с-тус*. В пользу первой гипотезы говорят данные о высоком уровне экспрессии *с-тус* в клетках лимфомы Беркита [64, 182], а второй — недавнее сообщение о соматической мутации, сходной с мутацией в вариабельной части иммуноглобулиновых генов [225].

Не исключено, что образование лимфомы Беркита представляет собой многоступенчатый процесс, в котором кроме трансформирующих генов участвует возможная аберрантная активность *с-тус*. Экспрессия гена *с-тус* может привести к иммортализации клеток, но не к полной трансформации. Например, индукцию лимфомы В-клеток у кур вирусами лейкоза птиц связывают с активацией двух генов — гена *с-тус* и трансформирующего гена [43]. Возможно, геном EBV играет роль индуктора транслокации *с-тус* и, кроме того, кодирует еще одну, трансформирующую функцию. Возможно также, что в клетках лимфомы Беркита активируются дополнительные клеточные протоонкогены либо непосредственно под действием генов EBV, либо из-за спонтанных мутаций, возникающих за время роста опухоли.

Трансформация с помощью гамма-герпесвирусов *H. saimiri* и *H. ateles*

Линии клеток, полученные из опухолей, индуцированных *H. saimiri* и *H. ateles*, содержат множество копий кольцевых замкнутых эписомных молекул вирусной ДНК [69, 139]. Транскрипционный анализ линии клеток, трансформированных *H. saimiri*, указывает на наличие единственного полиаденилированного вирусного транскрипта длиной 2,7 kb, соответствующего области 89—93 единиц карты; эта область транскрибируется во время предранней фазы продуктивной вирусной инфекции [151]. Структура вирусных транскриптов в трансформированных с по-

Рис. 12.9. Структура генома HBV-подобных вирусов. Черный треугольник — ковалентно связанный с ДНК белок. Обе цепи двухцепочечного вирусного генома линейны. Кольцевая конфигурация стабилизируется благодаря спариванию участков из 250—300 оснований, расположенных на 5'-концах полной минус-цепи и неполной плюс-цепи. (Из [275], с разрешения авторов.)



мощью EBV клетках существенно сложнее. По-видимому, транскрипт *H. saimiri* кодируется ранним геном, функция которого нужна для поддержания трансформации. Тем не менее никаких вирус-специфических белков в клетках, трансформированных *H. saimiri*, обычными иммунологическими методами обнаружить не удалось [68].

HBV-подобные вирусы

Уникальную структуру генома HBV-подобных вирусов иллюстрирует рис. 12.9. В вирионах, выделенных из сыворотки человека, содержится частично двухцепочечная молекула вирусной ДНК, образованная минус-цепью длиной 3,2 kb и более короткой плюс-цепью разной длины. Кольцевая конфигурация генома стабилизируется за счет перекрывания 5'-концевых последовательностей двух цепей длиной около 300 оснований. С 5'-концом минус-цепи ковалентно связан белок [83], который, по-видимому, играет роль затравки при синтезе минус-цепи ДНК. Кроме того, в вирусной частице присутствует ДНК-полимераза, которая *in vitro* способна осуществлять достройку плюс-цепи до полной двухцепочечной молекулы ДНК. Возможно, эта реакция идет также *in vivo*.

Данные о том, что HBV-вирусы могут трансформировать клетки по тому же механизму, что и адено-, полиома- и ретровирусы, т. е. путем интеграции и экспрессии специфических вирусных трансформирующих генов, отсутствуют. К сожалению, мы не располагаем культурами клеток или систем лабораторных животных, которые позволили бы изучить этот механизм трансформации клеток и идентифицировать предполагаемые кодируемые вирусом трансформирующие белки. Однако следует упомянуть о двух наблюдениях, имеющих отношение к механизму трансформации клеток HBV-вирусами. Это, во-первых, необычный способ репликации вирусной ДНК, включающий обратную

транскрипцию транскрипта вирусной РНК; вначале считалось, что такой механизм репликации встречается лишь у ретровирусов. Во-вторых, показано, что в клетках опухоли печени человека и североамериканского сурка вирусная ДНК находится в интегрированном состоянии. Рассмотрим эти два факта более подробно.

На основании анализа интермедиатов вирусной ДНК в печени утят, зараженных (естественным образом) вирусом гепатита В уток (DNHBV), была предложена новая схема репликации генома HBV-подобных вирусов [275]. Как видно из рис. 12.10, после проникновения в клетку вирусная ДНК достраивается до двухцепочечной структуры, после чего синтезируется полный плюс-РНК-транскрипт. Затем этот транскрипт (называемый *прегеномом*) упаковывается вместе с ДНК-полимеразой, образуя незрелый нуклеоид. Далее с помощью обратной транскриптазы синтезируется полная минус-цепь ДНК и одновременно разрушается прегеном. Эта минус-цепь служит матрицей для синтеза плюс-цепей ДНК внутри нуклеоида. Наконец, нуклеоид «одевается» в белковую оболочку, и образуется вирусная частица.

Интегрированную вирусную ДНК, содержащуюся в опухолях печени человека и североамериканского сурка, исследовали методом блот-гибридизации. Оказалось, что в клетках первичного гепатоцеллюлярного рака обычно присутствуют интегрированные последовательности ДНК вируса гепатита [22, 261]. По-видимому, опухолевые клетки моноклональны, поскольку одинаковая картина интеграции наблюдалась для разных проб одной и той же опухоли. В то же время для опухолей разных пациентов расположение ДНК-полос было неодинаковым; это свидетельствует о том, что вирусная ДНК встраивается в разные участки клеточного генома.

Хорошую модельную систему для изучения молекулярной биологии трансформации клеток HBV-подобными вирусами представляет собой вирус гепатита североамериканского сурка (WHV). WHV иммунологически родственен HBV; как показывает анализ нуклеотидной последовательности ДНК [74], он сходен с HBV и по своей генетической организации. WHV связан с гепатитами и гепатомами североамериканских сурков [276]; его ДНК встроена в клеточный геном и эти опухоли моноклональны [207]. Для двух случаев опухолей естественного происхождения места соединения клеточной и вирусной ДНК, содержащие единственный сайт интеграции, были клонированы и исследованы с помощью рестрикционного картирования и электронной микроскопии гетеродуплексов [207]. Последовательность вирусной ДНК оказалась в значительной степени перестроенной и содержала делеции. Никаких данных о сохранении большой откры-



Рис. 12.10. Предполагаемый путь репликации генома HBV-подобных вирусов (см. текст). (Из [275], с разрешения авторов.)

той рамки считывания, с использованием которой мог бы интегрироваться предполагаемый трансформирующий белок с мол. массой, превышающей 15К, получено не было. Эти результаты не согласуются с представлением о трансформирующих генах. Кроме того, в этих работах не был идентифицирован единый клеточный локус, по которому происходила бы интеграция вирусной ДНК; следовательно, они не согласуются также с представлением о встраивании промотора, согласно которому вирусная ДНК включается в клеточный геном вблизи онкогена и активирует его экспрессию, как это показано для вирусов лейкозов птиц [117, 200, 214].

Недавно были выполнены работы по изучению схемы интеграции ДНК HBV в геном линии клеток человека, полученной из ткани гепатоцеллюлярного рака [152]. Три разные последовательности интегрированной ДНК HBV были клонированы в бактериофаге лямбда; была проведена блот-гибридизация ДНК и определена ее нуклеотидная последовательность. Оказалось, что сайт интеграции вирусной ДНК располагается в одноцепочечной области ДНК HBV. Отсюда следует, что при интеграции используется определенная нуклеотидная последовательность вирусной ДНК. В отличие от описанного выше случая ДНК WNC [207], интегрированные участки ДНК HBV не содержали явных перестроек [152]. Изучение онкогенеза HBV-подобных вирусов только начинается, и мы пока не можем сделать никаких выводов о механизме трансформации клеток этими вирусами.

Пути онкогенеза и трансформации клеток под действием трансформирующих генов опухолеродных ДНК-вирусов, онкогенов ретровирусов и раковых клеток, а также химических канцерогенов: общие особенности вирусологии опухолей

Клетки, трансформированные опухолеродными вирусами, приобретают целый ряд новых биологических и биохимических свойств. Их появление, по-видимому, обуславливается активацией или респрессией специфических клеточных генов в результате плеiotропного действия кодируемых вирусом трансформирующих белков. Происхождение трансформирующих генов ДНК-содержащих опухолеродных вирусов не известно. Если они эволюционировали от клеточных генов, то произошла их значительная дивергенция, поскольку не наблюдается гибридизации трансформирующих генов опухолеродных ДНК-вирусов с клеточной ДНК. Напротив, трансформирующие гены ретровирусов (онкогены), по-видимому, произошли от клеточных генов, поскольку у многих видов позвоночных обнаружены клеточные гомологи онкогенов ретровирусов. Интересны в этом плане по-

лученные недавно данные, свидетельствующие о том, что трансформирующие гены E1A аденовирусов структурно родственны двум онкогенам ретровирусов *тус* и *туб*. Этот вывод, основанный на результатах компьютерного анализа расшифрованных нуклеотидных последовательностей ДНК [226], очень интересен, поскольку продукт гена *тус* и продукт гена E1A — это ядерные белки, которые вызывают иммортализацию первичных клеток. Кроме того, онкогены *v-тус* и *c-тус* содержат последовательности, гомологичные нескольким участкам генома цитомегаловируса человека [82, 270].

Недавно было установлено, что трансформирующие гены опухолеродных ДНК-вирусов и онкогены ретровирусов кодируют взаимозаменяемые функции. Более того, возможна комplementation онкогенной активности человеческих раковых онкогенов (клеточных гомологов онкогенов ретровирусов) функцией трансформирующих генов ДНК-содержащих опухолеродных вирусов. Эти данные позволяют предположить, что трансформирующие гены опухолеродных ДНК-вирусов кодируют функции, подобные функциям клеточных генов. Действительно, начатые в последнее время работы по идентификации клеточных генов-мишеней, активируемых во время онкогенеза, свидетельствуют о том, что основное внимание исследователей должно быть обращено на регуляцию экспрессии генов эукариот и клеточного роста. Сейчас наступила новая эра в изучении свойств и функций трансформирующих генов опухолеродных ДНК-вирусов и онкогенов.

Онкогенез, индуцируемый генами опухолеродных вирусов и клеточными онкогенами, — это многоступенчатый процесс, который включает по крайней мере два (а возможно, три и более) этапа. На первом из них, *иммортализации*, первичные клетки в культуре превращаются в клеточные линии с неограниченным временем жизни; это предотвращает запрограммированное старение первичных клеток или кризис, которые в норме происходят в культуре клеток. Функция иммортализации экспрессируется генами N-концевого домена Т-антигена Ру и SV40, генами E1A аденовирусов и онкогеном *тус*. Ретровирусы, которые содержат онкоген *тус* (например, вирус миелоцитоматоза птиц), связывают с широким спектром опухолей (в том числе с карциномами, саркомами), а также с лейкозами (подробно см. в работе [13]). Интересно также, что клеточный гомолог онкогена *тус* часто перестраивается и наблюдается более высокий уровень его экспрессии во многих В-клеточных лимфомах человека, в том числе в лимфоме Беркита (подробнее см. в работе [149]). Трансформирующие белки, кодируемые генами, которые детерминируют функцию иммортализации, — это, как правило, ДНК-связывающие белки, локализованные в клеточном ядре [56, 57].

На втором этапе, который можно назвать этапом *трансформации*, происходит индукция полного набора фенотипических изменений, связанных с онкогенной трансформацией клеток. Это морфологические изменения, способность расти в обедненной сывороткой среде, способность делиться без прикрепления к подложке и опухолеродность. Функция трансформации кодируется геном среднего Т-антигена Ру, генами Е1В аденовирусов, а также вирусным и клеточным онкогенами *ras*. Вирусные гены *ras*, кодируемые вирусом саркомы мыши Харви и Кирстена, трансдуцированы из клеточного генома крысы; при введении грызунам эти вирусы вызывают саркомы и лейкозы. Особенно важно (как с научной, так и с клинической точек зрения), что клеточные гомологи *ras* выделяются из самых разных опухолей человека, в том числе из карцином мочевого пузыря, легких и поджелудочной железы (подробнее см. в работе [13]). В нескольких случаях показано, что эти человеческие онкогены содержат точечные мутации в одном из двух сайтов; следовательно, изменение продукта гена *ras*, по-видимому, причинно связано со злокачественным состоянием клетки. Трансформирующие белки, ответственные за трансформирующую функцию, ассоциированы с плазматической мембраной и с цитоплазматическими мембранными структурами [13, 109, 266].

Гены опухолеродных вирусов и онкогены, кодирующие трансформирующую функцию, не влияют (или влияют очень слабо) на первичные клетки. Однако они могут трансформировать стабильные линии клеток, которые уже были иммортализованы либо путем введения вирусных или клеточных генов, кодирующих функцию иммортализации, либо в результате спонтанной мутации, либо под действием химических канцерогенов. В качестве примера можно привести средний Т-антиген Ру, который не способен трансформировать первичные клетки, но трансформирует стабильные клеточные линии или клетки, которые были ранее иммортализованы большим Т-антигеном Ру. Интересно, что функция аденовирусного Е1А может замещать функцию большого Т-антигена Ру; котрансекция первичных клеток плазмидами, одна из которых кодирует Е1А аденовируса, а другая — средний Т-антиген Ру, приводит к эффективной трансформации [246]. Таким образом, ген иммортализации одного ДНК-содержащего опухолеродного вируса может быть дополнен геном трансформации другого ДНК-содержащего опухолеродного вируса.

Функция иммортализации, кодируемая генами опухолеродных ДНК-вирусов и онкогена *тус* ретровируса, может дополнять трансформирующую функцию вирусных и клеточных онкогенов [162, 246]. Человеческий онкоген *ras*, выделенный из карциномы мочевого пузыря, трансформирует стабильную линию

ЗТЗ мышинных клеток, но не первичные или вторичные культуры клеток грызунов. Путем котрансфекции онкогеном *ras* и геном большого Т-антигена Ру [162] либо геном Т-антигена аденовирусного Е1А [246] может быть достигнута полная трансформация клеток грызунов в культуре. Более того, с помощью котрансфекции онкогенами *ras* и *myc* удается трансформировать также вторичные культуры клеток грызунов [162], а фибробласты хомячка, иммортализованные в культуре обработкой канцерогеном, трансформируются одним геном *ras* [204]. Все проведенные ранее работы показывают, что трансформирующие гены опухолеродных вирусов выполняют по крайней мере два класса биологических функций. Но, как мы уже отмечали, в свойствах клеток, которые экспрессируют вирусные трансформирующие гены, кодирующие биологическую функцию одного и того же класса, есть тонкие, но явные различия. Эти и другие данные указывают на то, что должна существовать третья участвующая в трансформации биологическая функция и что эту функцию могут выполнять какие-то спонтанные клеточные изменения или еще один, третий вирус-специфический ген.

Самые последние данные наводят на мысль, что опухолеродные ДНК-вирусы, ретровирусы и химические канцерогены активируют одни и те же клеточные гены. Таким образом, по-видимому, пути онкогенеза ограничены, и, возможно, основой злокачественности является аберрантная регуляция небольшой группы генов. Данные о том, что продукт какого-то гена SV40 активирует экспрессию специфических клеточных генов, были получены еще в ранних работах: заражение SV40 стимулировало синтез клеточной ДНК, рибосомной РНК и клеточной тимидинкиназы. Эти старые сведения согласуются с результатами экспериментов по гибридизации, показывающими, что примерно 3% последовательностей клеточной мРНК, присутствующих в трансформированных SV40 клетках, в нетрансформированных клетках отсутствуют. Самые последние работы, в которых проведен анализ библиотеки клонов кДНК, соответствующих мРНК клеток, трансформированных SV40, наводит на мысль, что экспрессия некоторых клеточных мРНК в трансформированных SV40 клетках усилена.

Библиотека кДНК-клонов была получена с помощью обратной транскрипции популяции мРНК мышинных клеток, трансформированных SV40, и последующего клонирования в плазмидных векторах [257, 258]. Затем был проведен скрининг на выявление тех видов мРНК, которые в трансформированных клетках представлены в более высокой концентрации, чем в нетрансформированных. При этом использовались два подхода. В одной работе проводили гибридизацию 430 клонов кДНК с мРНК трансформированных и нетрансформированных клеток, меченной

in vitro γ^{32} -P-АТФ с помощью полинуклеотидкиназы [257]. Уровень экспрессии клеточных мРНК, гомологичных трем из 430 клонов кДНК, в индуцированных SV40 опухолях и трансформированных клетках в 100 раз превышал нормальный. Транскрипты, соответствующие этим трем клонам кДНК, синтезировались на столь же высоком уровне в SV40-*ts*A-трансформированных клетках при пермиссивных температурах; отсюда следует, что экспрессию мРНК, по-видимому, регулировал большой Т-антиген SV40.

В другой работе с использованием мРНК из клеток, трансформированных SV40, была создана библиотека кДНК из 6400 клонов. Скрининг проводили путем гибридизации с кДНК-зондом; эта ДНК была обогащена последовательностями, специфичными для мРНК клеток, трансформированных SV40. Из 6400 клонов кДНК были идентифицированы и охарактеризованы 42 позитивных клон; по картине распределения рестрикционных фрагментов и по общим нуклеотидным последовательностям их можно разбить на четыре группы. Анализ клеточных линий, трансформированных SV40, позволил сделать следующий вывод: общая особенность процесса трансформации SV40 состоит в активации генов, соответствующих кДНК группы 1.

С рAG64 — прототипом кДНК-зонда группы 1 — гибридизуются три клеточные мРНК длиной 1,6, 0,7 и 0,6 kb. Во всех использованных линиях клеток, трансформированных SV40, наблюдается более высокая концентрация мРНК длиной 1,6 kb. Появление транскриптов длиной 0,7 и 0,6 kb, по-видимому, связано с переходом к более высокотрансформированному состоянию [258]. Повышенное содержание мРНК длиной 1,6 kb группы 1 отмечалось в случаях мышинных фибробластов, трансформированных вирусами Ру, саркомы Рауса и лейкоза мышей Абельсона, а также химическими канцерогенами метилхолантреном и метилхолантренэпоксидом [258]. Такой же эффект наблюдался в случае нефибробластных трансформированных мышинных клеток, в том числе в линиях клеток опухоли тимуса, опухолей молочных желез, в линии В-клеток, трансформированных вирусом лейкоза мышей Абельсона, в линии клеток нейробластомы и в линии клеток гепатомы крыс [24]. Таким образом, активация специфического гена группы 1 — это, по-видимому, общая особенность онкогенеза клеток грызунов. Повышенный уровень транскрипции генов группы 1, очевидно, коррелирует с экспрессией фенотипа, характерного для состояния трансформации, и с присутствием функционального большого Т-антигена. Это следует из результатов анализа SV40-*ts*-мутантов. Повышенное содержание транскриптов группы 2 наблюдалось у ограниченного числа трансформированных клеточных линий, индуцированных SV40 и дру-

гими агентами; работы по изучению клонов кДНК групп 3 и 4 пока не закончены [258].

кДНК-клоны группы 1, соответствующие тем видам мРНК, для которых в трансформированных клетках наблюдался более высокий уровень экспрессии, содержат повтор, встречающийся в разных местах генома мыши [196]. Блот-гибридизация РНК с использованием кДНК-зондов группы 1, содержащих этот повтор, выявила большое число клеточных мРНК, концентрация которых на протяжении периода эмбрионального развития мыши меняется. Транскрипты, гомологичные повтору группы 1, были впервые обнаружены у мышинных эмбрионов на 7-е сутки развития; их концентрация достигала максимума в период наиболее интенсивного роста эмбриона и начала развития органов (6,5—9,5 сут), а затем уменьшалась до величины, характерной для взрослой мыши. Интересно, что в линиях клеток эмбриональной карциномы, которые считаются эквивалентными плюрипотентным ранним эмбриональным клеткам, также синтезируется большое количество транскриптов, родственных группе 1. Если индуцировать дифференцировку клеток эмбриональной карциномы *in vitro*, то концентрация транскриптов, родственных группе 1, заметно падает [196]. Было высказано предположение, что повторяющийся элемент группы 1 действует как регуляторная последовательность, изменяющая уровень экспрессии генов группы 1. Эти чрезвычайно интересные данные согласуются с предложенной много лет назад гипотезой о том, что основой злокачественного процесса является аномальная экспрессия важных для роста и развития организма генов.

Дальнейшее изучение и функциональная характеристика клеточных генов, экспрессия которых в трансформированных клетках меняется, были бы чрезвычайно интересны и могли бы пролить свет на молекулярные механизмы, лежащие в основе как развития эмбрионов, так и злокачественных образований.

Литература

1. *Abcarian H., Sharon H.* (1982). Long-term effectiveness of the immunotherapy of anal condyloma acuminatum, *Dis. Colon Rectum.*, 25, 648—651.
2. *Ahola H., Stenlund A., Moreno-Lopez J., Petterson U.* (1983). Sequences of bovine papillomavirus type 1 DNA—Functional and evolutionary implications, *Nucleic Acids Res.*, 11, 2639—2649.
3. *Albrecht T., Rapp F.* (1973). Malignant transformation of hamster embryo fibroblasts following exposure to ultraviolet-irradiated human cytomegalovirus, *Virology*, 55, 53—61.
4. *Alestrom P., Stenlund A., Li P., Bellett A., Petterson U.* (1982). Sequence homology between avian and human adenoviruses, *J. Virol.*, 42, 306—310.
5. *Amtmann E., Sauer G.* (1982). Bovine papillomavirus transcription: Polyadenylated RNA species and assessment of the direction of transcription, *J. Virol.*, 43, 59—66.

6. *Amtmann E., Muller H., Sauer G.* (1980). Equine connective tissue tumors contain unintegrated bovine papilloma virus DNA, *J. Virol.*, **35**, 962—964.
7. *Aselin C., Gelinas C., Bastin M.* (1983). Role of the three polyoma virus early proteins in tumorigenesis, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1451—1459.
8. *Babiss L. E., Ginsberg H. S., Fisher P. B.* (1983). Coldsensitive expression of transformation by a host range mutant of type 5 adenovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1352—1356.
9. *Beasley R. P., Lin C.-C., Hwang L. Y., Chien C.-S.* (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan *Lancet*, **2**, 1129—1132.
10. *Berk A. J., Lee F., Harrison T., Williams J., Sharp P. A.* (1979). A pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs, *Cell*, **17**, 935—944.
11. *Bernards R., Schrier P. I., Bos J. L., van der Eb A. J.* (1983). Role of adenovirus type 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation, *Virology*, **127**, 45—53.
12. *Bernards R., Schrier P. I., Houweling A., Bos J. L., van der Eb A. J.* (1983). Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity, *Nature (Lond.)*, **305**, 776—779.
13. *Bishop J. M.* (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. In: *Annual Review of Biochemistry*, Vol. **52**, ed. by E. E. Snell, P. D. Boyer, A. Meister and C. C. Richardson, pp. 301—354, Annual Reviews, Inc., Palo Alto, California.
14. *Black P. H., Hartley J. W., Rowe W. P., Huebner R. J.* (1963). Transformation of bovine tissue culture cells by bovine papilloma virus, *Nature (Lond.)*, **199**, 1016—1018.
15. *Boirin M., Thomas M., Chenaille P.* (1965). A biological group of deoxyribonucleic acid extracted from bovine papilloma virus, *Virology*, **26**, 150—153.
16. *Bos J. L., ten Wolde-Kraamwinkel H. C.* (1983). The E1b promoter of Ad12 in mouse 1 tk⁻ cells is activated by adenovirus region E1a, *EMBO J.*, **2**, 73—76.
17. *Bos J. L., Polder L. J., Bernards R., Schrier P. I., van den Elsen P. J., van der Eb A. J., van Ormondt H.* (1981). The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets, *Cell*, **27**, 121—131.
18. *Bos J. L., Jochemsen A. G., Bernards R., Schrier P. I., van Ormondt H., van der Eb A. J.* (1983). Deletion mutants of region E1a of Ad12 E1 plasmids: Effect on oncogenic transformation, *Virology*, **129**, 393—400.
19. *Brackmann K. H., Green M., Wold W. S. M., Cartas M., Matsuo T., Hashimoto S.* (1980). Identification and peptide mapping of human adenovirus type 2-induced early polypeptides isolated by two-dimensional gel electrophoresis and immunoprecipitation, *J. Biol. Chem.*, **255**, 6772—6779.
20. *Brackmann K. H., Green M., Wold W. S. M., Rankin A., Lowenstein P. M., Cartas M. A., Sanders P. R., Olson K., Orth G., Jablonska S., Kremdorf D., Favre M.* (1983). Introduction of cloned human papillomavirus genomes into mouse cells and expression at the RNA level, *Virology*, **129**, 12—24.
21. *Branton P. E., Lassam N. J., Downey J. F., Yee S.-P., Graham F. L., Mak S., Bayley S. T.* (1981). Protein kinase activity immunoprecipitated from adenovirus-infected cells by sera from tumor-bearing hamsters, *J. Virol.*, **37**, 601—608.
22. *Brechot C., Pourcel C., Louise A., Rain B., Tiollais P.* (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma, *Nature (Lond.)*, **286**, 533—535.
23. *Brechot C., Pourcel C., Hadchouel M., Dejean A., Louise A., Scott J., Tiollais P.* (1982). State of hepatitis B virus DNA in liver diseases, *Hepatology*, **2**, 27S—34S.
24. *Brickell P. M., Latcham D. S., Murphy D., Willison K., Rigby P. W. J.*

- (1983). Activation of a Qa/T1a class I major histocompatibility antigen gene is a general feature of oncogenesis in the mouse, *Nature (Lond.)*, **306**, 756—760.
- 24a. *Brusca J. S., Jannun R., Chinnadurai G.* (1984). Efficient transformation of rat 3Y1 cells by human adenovirus type 9, *Virology*, **136**, 328—337.
 25. *Burnett J. P., Harrington J. A.* (1968). Simian adenovirus SA₇ DNA. Chemical, physical, and biological studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 1023—1029.
 26. *Burnett J. P., Harrington J. A.* (1968). Infectivity associated with simian adenovirus type SA₇ DNA, *Nature (Lond.)*, **220**, 1245.
 27. *Camacho A., Spear P.* (1978). Transformation of hamster embryo fibroblasts by a specific fragment of the herpes simplex virus genome, *Cell*, **15**, 993—1002.
 28. *Carlock L. R., Jones N. C.* (1981). Transformation-defective mutant of adenovirus type 5 containing a single altered E1a mRNA species, *J. Virol.*, **40**, 657—664.
 29. *Carmichael G. G., Schaffhausen B. S., Dorsky D. I., Oliver D. B., Benjamin T. L.* (1982). The carboxy terminus of polyoma middle-T antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3579—3583.
 30. *Casto B. C.* (1973). Enhancement of adenovirus transformation by treatment of hamster cells with ultraviolet radiation, DNA base analogs and dibenz[*a*]anthracene, *Cancer Res.*, **33**, 402—407.
 31. *Casto B. C.* (1981). Detection of chemical carcinogens and mutagens in hamster cells by enhancement of adenovirus transformation. In: *Advances in Modern Environmental Toxicology*, Vol. 1, ed. by N. Mishra, V. Dunkel, and M. Mehlman, pp. 241—271, Senate Press, Princeton Junction, New Jersey.
 32. *Casto B. C., Miyagi M., Meyers J., DiPaolo J. A.* (1979). Increased integration of viral genome following chemical and viral treatment of hamster embryo cells, *Chem. Biol. Interact.*, **25**, 255—269.
 33. *Chen E. Y., Howley P. M., Levinson A. D., Seeburg P. H.* (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome, *Nature (Lond.)*, **299**, 529—534.
 34. *Chinnadurai G.* (1983). Adenovirus 2 lp⁺ locus codes for a 19 kd tumor antigen that plays an essential role in cell transformation, *Cell*, **33**, 759—766.
 35. *Chinnadurai G., Fujinaga K., Rho M. H., van der Eb A. J., Green M.* (1978). Transcription of the transforming region of adenovirus type 5 in a rat cell line transformed by a small restriction fragment, *J. Virol.*, **28**, 1011—1014.
 36. *Chowdury K., Light S. E., Garon C. F., Ito Y., Israel M. A.* (1980). A cloned polyoma DNA fragment representing the 5' half of the early gene region is oncogenic, *J. Virol.*, **36**, 566—574.
 37. *Clanton D. J., Jariwalla R. J., Kress C., Rosenthal L. J.* (1983). Neoplastic transformation by a cloned human cytomegalovirus DNA fragment uniquely homologous to one of the transforming regions of herpes simplex virus type 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3826—3830.
 38. *Clayton C. E., Murphy D., Lovett M., Rigby P. W. J.* (1982). A fragment of the SV40 large-T antigen transforms, *Nature (Lond.)*, **299**, 59—61.
 39. *Coggin J. R. Jr., Hausen H.* (1979). Workshop on papillomaviruses and cancer, *Cancer Res.*, **39**, 545—546.
 40. *Colby W. W., Shenk T.* (1982). Fragments of the simian virus 40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5189—5193.
 41. *Collard W., Thornton H., Green M.* (1973). Cells transformed by human herpesvirus 2 transcribe virus-specific RNA sequences shared by herpesvirus type 1 and 2, *Nature (Lond.)*, **243**, 264—266.
 42. *Collard W., Thornton H., Mizell M., Green M.* (1973). Virus-free adenocar-

- cinoma of the frog (summer phase tumor) transcribes Lucké tumor herpesvirus-specific RNA, *Science*, **181**, 448—449.
43. *Cooper G. M., Neiman P. E.* (1981). Two distinct candidate transforming genes of lymphoid leukemia virus-induced neoplasms, *Nature (Lond.)*, **292**, 857—858.
 44. *Courtneidge S. A., Smith A. E.* (1983). Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene, *Nature (Lond.)*, **303**, 435—438.
 45. *Croissant O., Testanière V., Orth G.* (1982). Mise en évidence et localisation de régions conservées dans les génomes du papillomavirus bovin I par analyse d' "hétéroduplex" au microscope électronique, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **294**, 581—586.
 46. *Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J., Patterson D., Gallo R. C., Croce C. M.* (1982). Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7824—7827.
 47. *Danos O., Yaniv M.* (1983). Structure and function of papillomavirus genomes. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, ed. by G. Klein, pp. 59—81, Raven Press, New York.
 48. *Danos O., Katinka M., Yaniv M.* (1982). Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: A novel type of genome organization among Papovaviridae, *EMBO J.*, **1**, 231—237.
 49. *Danos O., Engel L. W., Chen E. Y., Yaniv M., Howley P. M.* (1983). Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes, *J. Virol.*, **46**, 557—566.
 50. *Deppert W., Walter G.* (1982). Domains of simian virus 40 large T antigen exposed on the cell surface, *Virology*, **122**, 56—70.
 51. *de Thé G.* (1982). Epidemiology of Epstein-Barr virus and associated diseases in man. In: *The Viruses. The Herpesviruses*, Vol. 1, ed. by B. Roizman, pp. 25—103, Plenum Press, New York.
 52. *de Thé G., Geser A., Day N., Tukei P., Williams E., Beri D., Smith P., Dean A., Bornkamm G., Feorino P., Henle W.* (1978). Epidemiologic evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study, *Nature (Lond.)*, **274**, 756—761.
 53. *Dijkema R., Dekker B. M. M., van Ormondt H.* (1982). Gene organization of the transforming region of adenovirus type 7 DNA, *Gene*, **18**, 143—156.
 54. *Dijkema R., Dekker B. M. M., van der Feltz J. M., van der Eb A. J.* (1979). Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses, *J. Virol.*, **32**, 943—950.
 55. *DiMaio D., Treisman R., Maniatis T.* (1982). Bovine papillomavirus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacterial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4030—4034.
 56. *Donner P., Greiser-Wilke I., Moelling K.* (1982). Nuclear localization and DNA binding of the transformant gene product of avian myelocytomatosis virus, *Nature (Lond.)*, **296**, 262—266.
 57. *Donner P., Bunte T., Greiser-Wilke I., Moelling K.* (1983). Decreased DNA-binding ability of purified transformation-specific proteins from deletion mutants of the acute avian leukemia virus MC29, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2861—2865.
 58. *Duff R., Rapp F.* (1971). Oncogenic transformation of hamster cells after exposure to herpes simplex virus type 2, *Nature (Lond.)*, **233**, 48—50.
 59. *Duff R., Rapp F.* (1973). Oncogenic transformation of hamster embryo cells after exposure to inactivated herpes simplex virus type 1, *J. Virol.*, **12**, 209—217.
 60. *Durst M., Gissmann L., Ikenberg H., zur Hausen H.* (1983). A papilloma virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy sam-

- ples from different geographic regions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3812—3815.
61. *Eckhart W., Hutchinson M. A., Hunter T.* (1979). An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T-antigen immunoprecipitates, *Cell*, **18**, 925—933.
 62. *Engel L. W., Heilman C. A., Howley P. M.* (1983). Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1, *J. Virol.*, **47**, 516—528.
 63. *Epstein M. A., Achong B. G., Barr Y. M.* (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma, *Lancet*, **1**, 702—703.
 64. *Erikson J., ar-Rushdi A., Drwinga H. L., Nowell P. C., Croce C. M.* (1983). Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 820—824.
 65. *Esche H., Mathews M. B., Lewis J. B.* (1980). Proteins and messenger RNAs of the transforming region of wild-type and mutant adenoviruses, *J. Mol. Biol.*, **142**, 399—417.
 66. *Favre M., Jibard N., Orth G.* (1982). Restriction mapping and physical characterization of the cottontail rabbit papillomavirus genome in transplantable VX2 and VX7 domestic rabbit carcinomas, *Virology*, **119**, 298—309.
 67. *Feldman L. T., Nevins J. R.* (1983). Localization of the adenovirus E1A protein, a positive-acting transcriptional factor, in infected cells, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 829—838.
 68. *Fleckenstein B., Desrosiers R. C.* (1982). Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateleus. In: *The Viruses. The Herpesviruses*, ed. by B. Roizman, pp. 253—332, Plenum Press, New York.
 69. *Fleckenstein B., Muller I., Werner F.-J.* (1977). The presence of Herpesvirus saimiri genomes in virus transformed cells, *Int. J. Cancer*, **19**, 546—554.
 70. *Fint J.* (1977). Two "early" mRNA species in adenovirus type 2 transformed rat cells, *J. Virol.*, **23**, 44—52.
 71. *Flint S. J., Sambrook J., Williams J., Sharp P. A.* (1976). Viral nucleic acid sequences in transformed cells. IV. A study of the sequences of adenovirus 5 DNA and RNA in four lines of adenovirus 5 transformed rodent cells using specific fragments of the viral genome, *Virology*, **72**, 456—470.
 72. *Frost E., Williams J.* (1978). Mapping temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue, *Virology*, **91**, 39—50.
 73. *Fujinaga K., Sawada Y., Sekikawa K.* (1979). Three different classes of human adenovirus transforming DNA sequences: Highly oncogenic subgroup A-, weakly oncogenic subgroup B-, and subgroup C-specific transforming DNA sequences, *Virology*, **93**, 578—581.
 74. *Galibert F., Chen T. N., Mandart E.* (1982). Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: Comparison with the hepatitis B virus sequence, *J. Virol.*, **41**, 51—65.
 75. *Gallimore P. H., Sharp P. A., Sambrook J.* (1974). Viral DNA in transformed cells. II. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in nine lines of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome, *J. Mol. Biol.*, **89**, 49—72.
 76. *Galos R. S., Williams J., Shenk T., Jones J.* (1980). Physical location of host-range mutations of adenovirus type 5: Deletion and marker-rescue mapping, *Virology*, **104**, 510—513.
 77. *Galloway D. A., McDougall J. K.* (1981). Transformation of rodent cells by a cloned DNA fragment of herpes simplex virus type 2, *J. Virol.*, **38**, 749—760.
 78. *Galloway D. A., McDougall J. K.* (1983). The oncogenic potential of herpes simplex viruses: Evidence for a "hit-and-run" mechanism, *Nature (Lond.)*, **302**, 21—24.
 79. *Gary G. W. Jr., Hierholzer J. C., Black R. E.* (1979). Characteristics of non-cultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: A new subgroup of human adenoviruses, *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 96—103.

80. Gaudrey P., Clertant P., Cuzin F. (1980). ATP phosphohydrolase activity of polyoma virus T-antigen, *Eur. J. Biochem.*, **109**, 553—560.
81. Gaudrey P., Tyndall C., Kamen R., Cuzin F. (1981). The high affinity binding site on polyoma virus DNA for the viral large-T antigen, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5697—5710.
82. Gelmann E. P., Clanton D. J., Jariwalla R. J., Rosenthal L. J. (1983). Characterization and location of myc homologous sequences in human cytomegalovirus DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5107—5111.
83. Gerlich W. H., Robinson W. S. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand, *Cell*, **21**, 801—809.
84. Gilead Z., Jeng Y.-H., Wold W. S. M., Sugaward K., Rho H. M., Harter M. L., Green M. (1976). Immunological identification of two adenovirus 2-induced early proteins possibly involved in cell transformation, *Nature (Lond.)*, **264**, 263—266.
85. Gingeras T. R., Sciaky D., Gelinas R. E., Bing-Dong J., Yen C. E., Kelly M. M., Bullock P. A., Parson B. L., O'Neill K. E., Roberts R. J. (1982). Nucleotide sequences from the adenovirus-2 genome, *J. Biol. Chem.*, **257**, 13475—13491.
86. Gissmann L., zur Hausen H. (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condyloma acuminatum), *Int. J. Cancer*, **25**, 605—609.
87. Gissmann L., Diehl V., Schultz-Coulton H.-J., zur Hausen H. (1982). Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma, *J. Virol.*, **44**, 393—400.
88. Gissmann L., Wolnik L., Ikenberg H., Koldovsky U., Schurch H. G., zur Hausen N. (1983). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 560—563.
89. Graham F. L. (1984). Transformation and oncogenicity by human adenovirus. In: *Advances in Virus Research* (in press).
90. Graham F. L., Harrison T., Williams J. (1978). Defective transforming capacity of adenovirus type-5 host-range mutants, *Virology*, **86**, 10—21.
91. Graham F. L., Abrahams P. J., Mulder C., Heijneker H. L., Warnaar S. O., de Vries F. A. J., Fries W., van der Eb A. J. (1974). Studies on in vitro transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 637—750.
92. Green M. (1970). Oncogenic viruses, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 701—756.
93. Green M. (1971). Search for adenovirus messenger RNA in cancers of man. In: *Oncology*, ed. by L. Clark, R. W. Cumley, J. E. McCay, and M. M. Copeland, pp. 156—165. Year Book Medical, Chicago, Illinois.
94. Green M. (1978). Adenovirus—Model systems of virus replication, human cell molecular biology, and neoplastic transformation. In: *Perspectives in Biology and Medicine*, Vol. 21, pp. 373—397, The University of Chicago, Chicago, Illinois.
95. Green M., Mackey J. K. (1977). Are oncogenic human adenoviruses associated with human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus transforming gene sequences. In: *Origins of Human Cancer*, Vol. 4, pp. 1027—1042, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
96. Green M., Wold W. S. M., Butiner W. (1981). Integration and transcription of group C human adenovirus sequences in the DNA of five lines of transformed rat cells, *J. Mol. Biol.*, **151**, 337—366.
97. Green M., Brackmann K. H., Cartas M. A., Matsuo T. (1982). Identification and purification of a protein encoded by the human adenovirus type 2 transforming region, *J. Virol.*, **42**, 30—41.
98. Green M., Brackmann K. H., Lucher L. A., Symington J. S. (1983). Antibodies to synthetic peptides targeted to the transforming genes of human adenoviruses: An approach to understanding early viral gene function. In: *Cur-*

- rent Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 109, ed. by W. Doerfler, pp. 167—192, Springer-Verlag, Berlin.
99. Green M., Mackey J. K., Wold W. S. M., Rigden P. (1979). Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homologies, *Virology*, **93**, 481—492.
 100. Green M., Wold W. S. M., Brackmann K. H., Cartas M. A. (1979). Identification of families of overlapping polypeptides coded by early "transforming" gene region 1 of human adenovirus type 2, *Virology*, **97**, 275—286.
 101. Green M., Wold W. S. M., Brackmann K., Cartas M. A. (1980). Studies on early proteins and transformation proteins of human adenoviruses, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **44**, 457—469.
 102. Green M., Wold W. S. M., Mackey J. K., Rigden P. (1979). Analysis of human tonsil and cancer DNAs and RNAs for DNA sequences of group C (serotypes 1, 2, 5, 6) human adenoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6606—6610.
 103. Green M., Brackmann K. H., Lucher L. A., Symington J. S., Kramer T. (1983). Human adenovirus 2 E1B-19K and E1B-53K tumor antigens: Antipeptide antibodies targeted to the NH₂ and COOH termini, *J. Virol.*, **48**, 604—615.
 104. Green M., Brackmann K. H., Sanders P. R., Loewenstein P. M., Freil J. H., Eisinger M., Switlyk S. A. (1982). Isolation of a human papillomavirus from a patient with epidermodysplasia verruciformis: Presence and related viral DNA genomes in human urogenital tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4437—4441.
 105. Green M., Orth G., Wold W. S. M., Sanders P. N., Mackey J. K., Favre M., Croissant O. (1981). Analysis of human cancers, normal tissues, and verrucae plantares for DNA sequences of human papillomaviruses types 1 and 2, *Virology*, **110**, 176—184.
 106. Green M. R., Mackey J. K., Green M. (1977). Multiple copies of human adenovirus 12 genomes are integrated in virus-induced hamster tumors, *J. Virol.*, **22**, 238—242.
 107. Green M. R., Treisman R., Maniatis T. (1983). Transcriptional activation of cloned human β -globin genes by viral immediate-early gene products, *Cell*, **35**, 137—148.
 108. Green M. R., Chinnadurai G., Mackey J. K., Green M. (1976). A unique pattern of integrated viral genes in hamster cells transformed by highly oncogenic human adenovirus 12, *Cell*, **7**, 419—428.
 109. Griffin B. E., Dilworth S. M. (1983). Polyomavirus: An overview of its unique properties. In: *Advances in Cancer Research*, Vol. 39, ed. by G. Klein and S. Weinhouse, pp. 183—268, Academic Press, New York.
 110. Griffin J. D., Spangler G., Livingston D. M. (1980). Enzymatic activities associated with the SV40 large T antigen, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **44**, 113—122.
 111. Groneberg J., Chardonnet Y., Doerfler W. (1977). Integrated viral sequences in adenovirus type 12-transformed hamster cells, *Cell*, **101**—111.
 112. Halbert D. N., Spector D. J., Raskas H. J. (1979). In vitro translation products specified by the transforming region of adenovirus type 2, *J. Virol.*, **31**, 621—629.
 113. Harrison T., Graham F., Williams J. (1977). Host range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells, *Virology*, **77**, 319—329.
 114. Harter M. L., Lewis J. B. (1978). Adenovirus type 2 early proteins synthesized in vitro and in vivo: Identification in infected cells of the 38,000- to 50,000-molecular-weight protein encoded by the left end of the adenovirus type 2 genome, *J. Virol.*, **26**, 736—749.
 115. Hassell J. A., Topp W. C., Rifkin D. B., Moreau P. E. (1980). Transformation of rat embryo fibroblasts by cloned polyoma virus DNA fragment containing only part of the early region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3978—3982.

116. *Hayward G. S., Reyes G. R.* (1983). Biochemical aspects of transformation by herpes simplex viruses. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, ed. by G. Klein, pp. 271—306, Raven Press, New York.
117. *Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M.* (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALB-induced leukosis, *Nature (Lond.)*, **290**, 475—480.
118. *Heilman C. A., Engel L., Lowy D. R., Howley P. M.* (1982). Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cells, *Virology*, **119**, 22—34.
119. *Henderson A., Ripley S., Heller M., Kieff E.* (1983). Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in burkitt tumor cell line and in lymphocytes grown transformed in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1987—1991.
120. *Hinze H. C.* (1971). New member of the herpesvirus group isolated from wild cottontail rabbits, *Infect. Immunol.*, **3**, 350—354.
121. *Ho Y.-S., Galos R., Williams J.* (1982). Isolation of type 5 adenovirus mutants with a cold-sensitive host range phenotype: Genetic evidence of an adenovirus transformation maintenance function, *Virology*, **122**, 109—124.
122. *Houweling A., van den Elsen P. J., van der Eb A. J.* (1980). Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5 fragment of adenovirus 5 DNA, *Virology*, **105**, 537—550.
123. *Huang E.-S., Boldogh I., Mar E.-C.* (1983). Human cytomegaloviruses: Evidence for possible association with human cancer. In: *Viruses Associated with Human Cancer*, ed. by L. A. Phillips, pp. 161—194, Marcel Dekker, New York.
124. *Huebner R. J., Rowe W. P., Lane W. T.* (1962). Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus type 12 and 18, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 2051—2058.
125. *Hurwitz D. R., Chinnadurai G.* (1984). Evidence that a second tumor antigen coded by adenovirus E1a region is required for oncogenic cell transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press).
126. *Huszar D., Bacchetti S.* (1983). Is ribonucleotide reductase the transforming function of herpes simplex virus 2? *Nature (Lond.)*, **301**, 76—79.
127. *Ide T., Whelley S., Baserga R.* (1977). Stimulation of RNA synthesis in isolated nuclei by partially purified preparations of simian virus 40 T-antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3189—3192.
128. *Igarashi K., Niiyama Y., Tsukamoto K., Kurokawa T., Sugino Y.* (1975). Biochemical studies on bovine adenovirus type 3. II. Incomplete virus, *J. Virol.*, **16**, 634—641.
129. *Igarashi K., Sasada R., Kurokawa T., Niiyama Y., Tsukamoto K., Sugino Y.* (1978). Biochemical studies on bovine adenovirus type 3. IV. Transformation by viral DNA and DNA fragments, *J. Virol.*, **28**, 219—226.
130. *Ishibashi M., Yasue H., Fujinaga K., Kawamata J.* (1980). The oncogenicity of avian adenoviruses. I. An unusually large number of viral DNA molecules in some tumors, and virus-specific T-antigenic proteins, *Virology*, **106**, 349—360.
131. *Ito Y.* (1960). A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits, *Virology*, **12**, 596—601.
132. *Ito Y., Spurr N., Griffin B.* (1980). Middle T antigen as a primary inducer of full expression of the phenotype of transformation by polyoma virus, *J. Virol.*, **35**, 219—232.
133. *Jagella H. P., Stegner H. E.* (1974). Zur dignitat der condylomata acuminata. Klinische, histopathologische und cytophotometrische befunde, *Arch. Gynecol.*, **216**, 119—132.
134. *Jariwalla R. J., Aurelian L., Ts'o P.* (1980). Tumorigenic transformation induced by a specific fragment of DNA from herpes simplex virus type 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2279—2283.
135. *Jariwalla R. J., Aurelian L., Ts'o P. O.* (1983). Immortalization and neoplas-

- tic transformation of normal diploid cells by defined cloned DNA fragments of herpes simplex virus type 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5902—5906.
136. Jarrett W. F. H., McNeil P. E., Grimshaw W. T. R., Selman I. E., McIntyre W. I. M. (1978). High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus, *Nature (Lond.)*, **274**, 215—217.
 137. Jensen A. B., Rosenthal J. R., Olson C., Pass F., Lancaster W. D., Shah K. (1980). Immunological relatedness of papillomaviruses from different species, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 495—500.
 138. Johanson K., Persson H., Lewis A. M., Pettersson U., Tibbetts C., Philipson L. (1978). Viral DNA sequences and gene products in hamster cells transformed by adenovirus type 2, *J. Virol.*, **27**, 628—639.
 139. Johnson D. R., Ohno S., Kaschka-Dierich C., Fleckenstein B., Klein G. (1981). Relationship between Herpesvirus ateles associated nuclear antigen (HATNA) and the number of viral genome equivalents in HVA-carrying lymphoid lines, *J. Gen. Virol.*, **52**, 221—226.
 140. Jones N., Shenk T. (1979). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3665—3669.
 141. Jones N., Shenk T. (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells, *Cell*, **17**, 683—689.
 142. Johnson N., Ankerst J. (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation, *Cancer*, **39**, 2513—2519.
 143. Katze M. G., Persson H., Philipson L. (1981). Control of adenovirus early gene expression: Posttranscriptional control mediated by both viral and cellular gene products, *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 807—813.
 144. Katze M. G., Persson H., Phillipson L. (1982). A novel mRNA and a low molecular weight polypeptide encoded in the transforming region of adenovirus DNA, *EMBO J.*, **1**, 783—790.
 145. Kazal H. L., Long J. P. (1958). Squamous cell papillomas of the uterine cervix, *Cancer*, **11**, 1049—1059.
 146. Kidd J. G., Rous P. (1940). Cancers deriving from the virus papillomas of wild rabbits under natural conditions, *J. Exp. Med.*, **71**, 469—494.
 147. Kieff E., Dambaugh T., Hummel M., Heller M. (1983). Epstein-Barr virus. Transformation and replication. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, ed. by G. Klein, pp. 133—182, Raven Press, New York.
 148. Kimura T., Sawada Y., Shinawawa M., Shimizu Y., Shiroki K., Shimojo H., Sugisaki H., Takanami M., Uemizu Y., Fujinaga K. (1981). Nucleotide sequence of the transforming early region E1b of adenovirus type 12 DNA: Structure and gene organization, and comparison with those of adenovirus type 5 DNA, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6571—6589.
 149. Klein G. (1983). Specific chromosomal translocation and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men, *Cell*, **32**, 311—315.
 150. Knipe D. M. (1982). Cell growth transformation by herpes simplex virus, *Prog. Med. Virol.*, **28**, 114—144.
 151. Knust E., Dietrich W., Fleckenstein B., Bodemer W. (1983). Virusspecific transcript in a Herpesvirus saimiri-transformed lymphoid tumor cell line, *J. Virol.*, **48**, 377—383.
 152. Koshy R., Koch S., von Loringhoven A. F., Kahmann R., Murray R., Hofschneider P. H. (1983). Integration of hepatitis B virus DNA: Evidence for integration in the single-stranded gap, *Cell*, **34**, 215—223.
 153. Kremsdorf D., Jablonska S., Faure M., Orth G. (1982). Biochemical characterization of two types of human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis, *J. Virol.*, **43**, 436—447.
 154. Kremsdorf D., Jablonska S., Faure M., Orth G. (1983). Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning

- and biochemical characterization of Human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes, *J. Virol.*, **48**, 340—351.
155. Krzyzek R. A., Watts S. L., Anderson D. L., Faras A. J., Pass F. (1980). Anogenital warts contain several distinct species of human papillomavirus, *J. Virol.*, **36**, 236—244.
 156. Kuppuswamy M. N., Chinnadurai G. (1984). The C-terminus of the adenovirus 2 E1a gene is not essential for the regulation of expression of other viral early genes, (Submitted for publication.)
 157. Kurman R. J., Shah K. H., Lancaster W. D., Jenson A. B. (1981). Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulgar codylomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **140**, 931—935.
 158. Lancaster W. (1981). Apparent lack of integration of bovine papillomavirus DNA in virus-induced equine and bovine tumor cells and virus-transformed mouse cells, *Virology*, **108**, 251—255.
 159. Lancaster W. D., Olson C. (1980). State of bovine papillomavirus DNA in connective-tissue tumors. In: *Viruses in Naturally Occurring Cancers*, Vol. 7, ed. by M. Essex, G. Todaro, and H. zur Hausen, pp. 223—232, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 160. Lancaster W. D., Olson C. (1982). Animal papillomaviruses, *Microbiol. Rev.*, **46**, 191—207.
 161. Lancaster W. D., Olson C., Meinke W. (1977). Presence of virus-specific DNA sequences in naturally occurring equine tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 524—528.
 162. Land H., Parada L. F., Weinberg R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, *Nature (Lond.)*, **304**, 596—608.
 163. Lane D. P., Crawford L. V. (1979). Large-T antigen is bound to a host cell protein in SV40-transformed cells, *Nature (Lond.)*, **278**, 261—263.
 164. La Porta R. F., Taichman L. B. (1982). Human papilloma viral DNA replicates as a stable episome in cultured epidermal keratinocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3393—3397.
 165. Lassam N. J., Bayley S. T., Graham F. L. (1979). Tumor antigens of human Ad5 in transformed cells and in cells infected with transformation-defective host-range mutants, *Cell*, **18**, 781—791.
 166. Lassam N. J., Bayley S. T., Graham F. L., Branton P. E. (1979). Immunoprecipitation of protein kinase activity from adenovirus 5-infected cells using antiserum directed against tumour antigens, *Nature (Lond.)*, **277**, 241—243.
 167. Lavery C. R., Russell P., Hills E., Booth N. (1978). The significance of non-condylomatous wart virus infection of the cervical transformation zone: A review with discussion of two cases, *Acta Cytol.*, **21**, 373—378.
 168. Law M. F., Lowy D. R., Dvoretzky I., Howley P. M. (1981). Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2727—2731.
 169. Levinson A. D., Levine A. J. (1977). The group C adenovirus tumor antigens: Infected and transformed cells and a peptide map analysis, *Cell*, **11**, 871—879.
 170. Lewis J. B., Mathews M. B. (1980). Control of adenovirus early gene expression: A class of immediate early proteins, *Cell*, **21**, 303—313.
 171. Lewis J. B., Atkins J. F., Baum P. R., Solem R., Gesteland R. B., Anderson C. W. (1976). Location and identification of the genes for adenovirus type 2 early polypeptides, *Cell*, **7**, 141—151.
 172. London W. T. (1983). Hepatitis B virus and primary hepatocellular carcinoma. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, ed. by G. Klein, pp. 325—341, Raven Press, New York.
 173. Lowy D. R., Dvoretzky I., Shober R., Law M. F., Engel L., Howley P. M. (1980). In vitro tumorigenic transformation by a defined subgenomic fragment of bovine papillomavirus DNA, *Nature (Lond.)*, **287**, 72—74.

174. *Lucher L. A., Brackmann K. H., Symington J. S., Green M.* (1984). Antibody directed to a synthetic peptide encoding the NH₂ terminal 16 amino acids of the adenovirus type 2 EIB-53K tumor antigen recognized the EIB-20K tumor antigen, *Virology*, **132**, 217—221.
175. *Lucher L. A., Brackmann K. H., Kimelman D., Symington J. S., Cartas M. A., Thornton H., Green M.* (1984). Identification with anti-peptide antibody of adenovirus 12 encoded E1A tumor antigens synthesized in infected and transformed mammalian cells and in *Escherichia coli*. (Submitted for publication.)
176. *Lucké B.* (1934). A neoplastic disease of the kidney of the frog, *Rana pipiens*, *Am. J. Cancer.*, **20**, 352—379.
177. *Lusky M., Berg L., Weiher H., Botchan M.* (1983). Bovine papilloma virus contains an activator of gene expression at the distal end of the early transcription unit, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1108—1122.
178. *Mackey J. K., Rigden P. M., Green M.* (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4657—4661.
179. *Mackey J. K., Green M., Wold W. S. M., Rigden P.* (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4, *J. Natl. Cancer Inst.*, **62**, 23—26.
180. *Mackey J. K., Wold W. S. M., Rigden P., Green M.* (1979). Transforming regions of group A, B, and C adenoviruses: DNA homology studies with twenty-nine human adenovirus serotypes, *J. Virol.*, **29**, 1056—1064.
181. *Maitland N. J., Kinross J. H., Busuttill A., Ludgate S. M., Smart G. E., Jones K. W.* (1981). The detection of DNA tumor virus-specific RNA sequences in abnormal human cervical biopsies by in situ hybridization, *J. Gen. Virol.*, **55**, 123—137.
182. *Marcu K. B., Harris L. J., Stanton L. W., Erikson J., Watt R., Croce C. M.* (1983). Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 519—523.
183. *Mark D., Berg P.* (1980). A third splice site in SV40 early mRNA, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 55—62.
184. *Martin R. G.* (1981). The transformation of cell growth and transmigration of DNA synthesis by SV40, *Adv. Cancer Res.*, **34**, 1—68.
185. *Matsuo T., Wold W. S. M., Hashimoto S., Rankin A. R., Symington J., Green M.* (1982). Polypeptides encoded by early transforming region E1b of human adenovirus 2: Immunoprecipitation from transformed and infected cells and cell free translation of E1b-specific mRNA, *Virology*, **118**, 456—465.
186. *Mayne N., Burnett J. P., Butler L. K.* (1971). Tumor incidence by simian adenovirus SA7 DNA, *Nature (Lond.)*, **232**, 82—183.
187. *McDougall J. K., Crum C. P., Fenoglio C. M., Goldstein L. C., Gallo-way D. A.* (1982). Herpesvirus-specific RNA and protein in carcinoma of the uterine cervix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3853—3857.
188. *Meisels A., Fortin R.* (1976). Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns, *Acta Cytol.*, **20**, 505—509.
189. *Meisels A., Fortin R., Roy M.* (1977). Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study, *Acta Cytol.*, **21**, 379—390.
190. *Mercer W. D., Nelson D., DeLeo A. B., Old O. J., Baserga R.* (1982). Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 313 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6309—6312.
191. *Mizell M., Toplin T., Isaacs J. J.* (1969). Tumor induction in developing frog kidneys by a zonal centrifuge purified fraction of the frog herpes-type virus, *Science*, **165**, 1134—1137.
192. *Molnar-Kimber K. L., Summers J., Taylor J. M., Mason W. S.* (1983). Protein

- covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus, *J. Virol.*, **45**, 165—172.
193. Montell C., Courtois G., Eng C., Berk A. (1984). Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins, *Cell*, **35**, 951—961.
 194. Montell C., Fisher E. F., Caruthers M. H., Berk A. J. (1982). Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis at a mRNA splice site, *Nature (Lond.)*, **295**, 380—384.
 195. Müller H., Gissmann L. (1978). *Mastomys natalensis* papilloma virus the virus particle, *J. Gen. Virol.*, **41**, 315—323.
 196. Murphy D., Brickell P. M., Latchmann D. S., Willison K., Rigby P. W. J. (1983). Transcripts regulated during normal embryonic development and oncogenic transformation share a repetitive element, *Cell*, **35**, 865—871.
 197. Nakabayashi Y., Chattopadhyay S. K., Lowy D. R. (1983). The transforming function of bovine papillomavirus DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5832—5836.
 198. Naseri M., Wettstein F. O., Stevens J. G. (1982). Two colinear and spliced viral transcripts are present in non-virus-producing benign and malignant neoplasms induced by the Shope (rabbit) papilloma virus, *J. Virol.*, **44**, 263—268.
 199. Neel B. G., Jhanwar S. C., Chaganti R. S. K., Hayward W. S. (1982). Two human *c-onc* genes are located on the long arm of chromosome 8, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7842—7846.
 200. Neel B. G., Hayward W. S., Robinson H. L., Fang J., Astrin S. M. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNA's: Oncogenesis by promoter insertion, *Cell*, **23**, 323—334.
 201. Nelson J. A., Fleckenstein B., Galloway D. A., McDougall J. K. (1982). Transformation of NIH 313 cells with cloned fragments of human cytomegalovirus strain AD169, *J. Virol.*, **43**, 83—91.
 202. Nevins J. R. (1981). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product, *Cell*, **26**, 213—220.
 203. Nevins J. R. (1982). Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product, *Cell*, **29**, 913—919.
 204. Newbold R. F., Overell R. W. (1983). Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene, *Nature (Lond.)*, **304**, 648—651.
 205. Novak U., Griffin B. (1981). Requirement for the C-terminal region of middle T-antigen in cellular transformation by polyoma virus, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2055—2073.
 206. Novak U., Dilworth S. M., Griffin B. E. (1980). Coding capacity of a 35% fragment of the polyoma virus genome is sufficient to initiate and maintain cellular transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3278—3282.
 207. Ogston C. W., Jonak G. J., Rogler C. E., Astrin S. M., Summers J. W. (1982). Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks, *Cell*, **29**, 385—394.
 208. Orth G., Favre M., Jablonska S., Brylak K., Croissant O. (1978). Viral sequences related to a human skin papillomavirus in genital warts, *Nature (Lond.)*, **275**, 334—336.
 209. Orth G., Favre M., Breitburd F., Croissant O., Jablonska S., Obalek S., Jarzabek-Chorzelska M., Rzeska G. (1980). Epidermodysplasia verruciformis: A model for the role of papilloma virus in human cancer. In: *Virus in Naturally Occurring Cancers*, Vol. 7, ed. by M. Essex, G. Todaro, and H. zur Hausen, pp. 259—282, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 210. Ostrow R. S., Krzyzek R., Pass F., Faras A. J. (1981). Identification of a

- novel human papilloma virus in cutaneous warts of meathandlers, *Virology*, **108**, 21—27.
211. *Ostrow R. S., Bender M., Nimura M., Seki T., Kawashima M., Pass F., Faras A. J.* (1982). Human papillomavirus DNA in cutaneous primary and metastasized squamous cell carcinomas from patients with epidermodysplasia verruciformis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1634—1638.
 212. *Pavlakakis G. N., Hamer D. H.* (1983). Regulation of a metallothionein growth hormone hybrid gene in bovine papilloma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 397—401.
 213. *Payne L. N.* (1982). Biology of Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. In: *The Viruses. The Herpesviruses*, Vol. 1, ed. by B. Roizman, pp. 347—431, Plenum Press, New York.
 214. *Payne G. S., Courtneidge S. A., Crittenden L. B., Fadly A. M., Bishop J. M., Varmus H. E.* (1981). Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: Viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state, *Cell*, **23**, 311—322.
 215. *Persson H., Katze M. G., Philipson H.* (1982). An adenovirus tumor antigen associated with membranes in vivo and in vitro, *J. Virol.*, **42**, 905—917.
 216. *Persson H., Monstein H.-J., Akusjärvi G., Philipson L.* (1981). Adenovirus early gene products may control viral mRNA accumulation and translation in vivo, *Cell*, **23**, 485—496.
 217. *Perricaudet M., Akusjärvi G., Virtanen A., Pettersson U.* (1979). Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses, *Nature (Lond.)*, **281**, 694—696.
 218. *Pettersson U., Akusjärvi G.* (1983). Molecular biology of adenovirus transformation. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, ed. by G. Klein, pp. 83—131, Raven Press, New York.
 219. *Pfister H., Nurnberger F., Gissmann L., zur Hausen H.* (1981). Characterization of human papillomavirus from epidermodysplasia verruciformis lesions of a patient from Upper-Volta, *Int. J. Cancer*, **27**, 645—650.
 220. *Pfister H., Hettich I., Runne U., Gissmann L., Chiff G. N.* (1983). Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions, *J. Virol.*, **47**, 363—366.
 221. *Piña M., Green M.* (1965). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 547—551.
 222. *Pipas J. M., Peden K. W. C., Nathans D.* (1983). Mutational analysis of SV40 large T-antigen: Isolation and characterization of mutants with deletions in the T-antigen gene, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 203—213.
 223. *Postel E. H., Levine A. J.* (1976). The requirement of simian virus 40 gene A product for the stimulation of cellular thymidine kinase activity after viral infection, *Virology*, **73**, 206—215.
 224. *Purola E., Savia E.* (1977). Cytology of gynecologic condyloma acuminatum, *Acta Cytol.*, **21**, 26—31.
 225. *Rabbits T. H., Hamlyn P. H., Baer R.* (1983). Altered nucleotide sequences of a translocated *c-myc* gene in Burkitt lymphoma, *Nature (Lond.)*, **306**, 760—765.
 226. *Ralston R., Bishop J. M.* (1983). The protein products of the *myc* and *myb* oncogenes and adenovirus E1a are structurally related, *Nature (Lond.)*, **306**, 803—806.
 227. *Rassoulzadegan M., Cowie A., Carr A., Glaichenhaus N., Kamen R., Cuzin F.* (1982). The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation, *Nature (Lond.)*, **300**, 713—718.
 228. *Rassoulzadegan M., Naghashfar Z., Cowie A., Carr A., Grisoni M., Kamen R., Cuzin F.* (1983). Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4354—4358.

229. *Rawls W. E., Clarke A., Smith K. O., Docherty J. J., Gilman S. C., Graham S.* (1980). Specific antibodies to herpes simplex virus type 2 among women with cervical cancer. In: *Viruses in Naturally Occurring Cancers*, Vol. 7, ed. by M. Essex, G. Todaro, and H. zur Hausen, pp. 117—133, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
230. *Reid R., Laverty C. R., Coppleson M., Isarangkul W., Hills E.* (1980). Non-codylomatous cervical wart virus infection, *Obstet. Gynecol.*, **55**, 476—483.
231. *Reid R., Stanhope C. R., Herschman B. R., Booth E., Phibbs G. D., Smith J. P.* (1982). Genital warts and cervical cancer. I. Evidence of an association between subclinical papillomavirus infection and cervical malignancy, *Cancer*, **50**, 377—387.
232. *Retter M., Middleton P. J., Tam J. S., Petric M.* (1979). Enteric adenoviruses: Detection, replication, and significance, *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 574—578.
233. *Reyes G. R., LaFemina R., Hayward S. D., Hayward G. S.* (1980). Morphological transformation by DNA fragments of human herpesviruses: Evidence for two distinct transforming regions in herpes simplex virus type 1 and 2 lack of correlation with biochemical transfer of the thymidine kinase gene, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 629—641.
234. *Ricciardi R. P., Jones R. L., Cepki C. L., Sharp P. A., Roberts B. E.* (1981). Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6121—6125.
235. *Rigby P. W. J., Lane D. R.* (1983). Structure and function virus 40 large T antigen. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, ed. by G. Klein, pp. 31—57, Raven Press, New York.
236. *Robinson R. A., O'Callaghan D. J.* (1983). A specific viral DNA sequence in stably integrated in herpesvirus oncogenically transformed cells, *Cell*, **32**, 569—578.
237. *Robinson R. A., Vance R. B., O'Callaghan D. J.* (1980). Oncogenic transformation by equine herpesviruses. II. Coestablishment of persistent infection and oncogenic transformation of hamster embryo cells by equine herpesvirus type 1 preparation enriched for defective interfering particles, *J. Virol.*, **36**, 204—219.
238. *Robinson R. A., Henry B. E., Duff R. G., O'Callaghan D. J.* (1980). Oncogenic transformation by equine herpesviruses (EHV). I. Properties of hamster embryo cells transformed by ultraviolet-irradiated EHV-1, *Virology*, **101**, 335—362.
239. *Robinson R. A., Tucker P. W., Dauenhauer S. A., O'Callaghan D. J.* (1981). Molecular cloning of equine herpesvirus type 1 DNA: Analysis of standard and defective viral genomes and viral sequences in oncogenically transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6684—6688.
240. *Roizman B.* (1982). The family herpesviridae: General description, taxonomy, and classification. In: *The Viruses. The Herpesviruses*, Vol. 1, ed. by B. Roizman, pp. 1—23, Plenum Press, New York.
241. *Ross S. R., Levine A. J., Galos R. S., Williams J., Shenk T.* (1980). Early viral proteins in HeLa cells infected with adenovirus type 5 host range mutants, *Virology*, **103**, 475—492.
242. *Rowe D. T., Graham F. L.* (1983). Transformation of rodent cells by DNA extracted from transformation-defective adenovirus mutants, *J. Virol.*, **46**, 1039—1044.
243. *Rowe D. T., Graham F. L., Branton P. E.* (1983). Intracellular localization of adenovirus type 5 tumor antigens in productively infected cells, *Virology*, **129**, 456—468.
244. *Rowe D. T., Yee S.-P., Otis J., Graham F. L., Branton P. E.* (1983). Characterization of human adenovirus type 5 early region E1A polypeptides using antitumor sera and an antiserum specific for the carboxy terminus, *Virology*, **127**, 253—271.
245. *Ruben M., Bacchetti S., Graham F. L.* (1982). Integration and expression of

- viral DNA in cells transformed by host range mutants of adenovirus type 5, *J. Virol.*, **41**, 674—685.
246. *Ruley H. E.* (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture, *Nature (Lond.)*, **304**, 602—606.
 247. *Sambrook J., Greene R., Stringer J., Mitchison J., Hu S. L., Botchan M.* (1980). Analysis of the sites of integration of viral DNA sequences in rat cells transformed by adenovirus 2 or SV40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 569—584.
 248. *Santos M., Butel J. S.* (1982). Association of SV40 large tumor antigen and cellular proteins on the surface of SV40 transformed mouse cells, *Virology*, **120**, 1—17.
 249. *Sarma P. S., Huebner R. J., Lane W. T.* (1965). Induction of tumors in hamsters with an avian adenovirus (CELO), *Science*, **149**, 1108.
 250. *Sarnow P., Ho Y. S., Williams J., Levine A. J.* (1982). Adenovirus E1b-53kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells, *Cell*, **28**, 387—394.
 251. *Sarver N., Byrne J. C., Howley P. M.* (1982). Transformation and replication in mouse cells of a bovine papillomavirus-pML2 plasmid vector that can be rescued in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7147—7151.
 252. *Sarver N., Gruss P., Law M. F., Khoury G., Howley P. M.* (1981). Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: A novel eukariotic cloning vector, *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 486—496.
 253. *Sawada Y., Fujinaga K.* (1980). Mapping of adenovirus 12 mRNAs transcribed from the transforming region, *J. Virol.*, **36**, 639—651.
 254. *Schlegel R., Benjamin T.* (1978). Cellular alterations dependent upon the polyoma virus Hr-t function: Separation of mitogenic from transforming capacities, *Cell*, **14**, 587—599.
 255. *Schrier P. I., van den Elsen P. J., Hertoghs J. J. L., van der Eb A. J.* (1979). Characterization of tumor antigens in cells transformed by fragments of adenovirus type 5 DNA, *Virology*, **99**, 372—385.
 256. *Schrier P. I., Bernards R., Vaessen R. T. M. J., Houweling A., van der Eb A. J.* (1983). Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells, *Nature (Lond.)*, **305**, 771—775.
 257. *Schutzbank T., Robinson R., Oren M., Levine A. J.* (1982). SV40 large tumor antigen can regulate some cellular transcripts in a positive fashion, *Cell*, **30**, 481—490.
 - 257a. *Schwarz E., Durst M., Demankowski C., Lattemann O., Zech R., Wolfspurger E., Suhai S., zur Hausen H.* (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b, *The EMBO J.*, **2**, 2341—2348.
 258. *Scott M. R. D., Westphal K.-H., Rigby P. W. J.* (1983). Activation of mouse genes in transformed cells, *Cell*, **34**, 557—567.
 259. *Segawa K., Ito Y.* (1982). Differential subcellular localization of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated middle-sized tumor antigen of polyoma virus and its relationship to middle-sized tumor antigen phosphorylating activity in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6812—6816.
 260. *Sekikawa K., Shiroki K., Shimojo H., Ojima S., Fujinaga K.* (1978). Transformation of a rat cell line by an adenovirus type 7 DNA fragment, *Virology*, **88**, 1—7.
 261. *Shafritz D. A., Kew M. C.* (1981). Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas, *Hepatology*, **1**, 1—8.
 262. *Shenk T., Jones N., Colby W., Fowlkes D.* (1980). Functional analysis of adenovirus-5 host-range deletion mutants defective for transformation in rat embryo cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 367—375.

263. Shiroki K., Maruyama K., Saito I., Fukui Y., Shimojo H. (1981). Incomplete transformation of rat cells by a deletion mutant of adenovirus type 5, *J. Virol.*, **38**, 1048—1054.
264. Shiroki K., Shimojo H., Sawada Y., Uemizu Y., Fujinaga K. (1979). Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA, *Virology*, **95**, 127—136.
265. Shiroki K., Handa H., Shimojo H., Yano S., Ojima S., Fujinaga K. (1977). Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA, *Virology*, **82**, 462—471.
266. Smith A. E., Ely B. K. (1983). The biochemical basis of transformation by polyoma virus. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, ed. by G. Klein, pp. 3—30, Raven Press, New York.
267. Solnick D., Anderson M. A. (1982). Transformation-deficient adenovirus mutant defective in expression of region 1A but not region 1B, *J. Virol.*, **42**, 106—113.
268. Soprano K. J., Galanti N., Jonak G. J., McKercher S., Pipas J. M., Peden K. W. C., Baserga R. (1983). Mutational analysis of Simian virus 40: Stimulation of cellular DNA synthesis and activation of rRNA genes by mutants with deletions in the T-antigen gene, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 214—219.
269. Southern P. J., Berg P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter, *J. Mol. Appl. Gen.*, **1**, 327—341.
270. Spector D. H., Vacquier J. P. (1983). Human cytomegalovirus (strain AD169) contains sequences related to the avian retrovirus oncogene v-myc, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3889—3893.
271. Staufienbiel M., Deppert W. (1983). Different structural systems of the nucleus are targets for SV40 large T antigen, *Cell*, **33**, 173—181.
272. Steinberg B. M., Topp W. C., Schneider P. S., Abramson A. L. (1983). Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission, *N. Engl. J. Med.*, **308**, 1261—1264.
- 272a. Subramanian T., Kuppuswamy M., Mak S., Chinnadurai G. (1984). Adenovirus *cyt*⁺ locus, which controls cell transformation and tumorigenicity, is an allele of *lp*⁺ locus, which codes for a 19-kilodalton tumor antigen, *J. Virology* (in press).
- 272b. Subramanian T., Kuppuswamy M., Gysbers J., Mak S., Chinnadurai G. (1984). 19-kDa tumor antigen coded by early region E1b of adenovirus 2 is required for efficient synthesis and for protection of viral DNA, *J. Biol. Chem.*, **259**, 11, 777—11, 784.
273. Sugisaki H., Sugimoto K., Takanami M., Shiroki K., Saito I., Shimojo H., Sawada Y., Uemizu Y., Uesugi S.-I., Fujinaga K. (1980). Structure and gene organization in the transforming *Hind*III-G fragment of Ad12, *Cell*, **20**, 777—786.
274. Summers J., Mason W. S. (1982). Properties of the hepatitis B-like viruses related to their taxonomic classification, *Hepatology*, **2**, 61S—66S.
275. Summers J., Mason W. S. (1982). Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate, *Cell*, **29**, 403—415.
276. Summers J., Smolec J. M., Snyder R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4533—4537.
277. Syrjänen K. J. (1980). Condylomatous epithelial changes in the uterine cervix and their relationship to cervical carcinogenesis, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, **17**, 415—420.
278. Syrjänen K. J. (1980). Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix, *Lung*, **158**, 131—142.
279. Syrjänen K. J. (1980). Epithelial lesions suggestive of a condylomatous ori-

- gin found closely associated with invasive bronchial squamous cell carcinomas, *Respiration*, **40**, 150—160.
280. *Syrjänen K. J.* (1982). Histological changes identical to those of condylomatous lesions found in esophageal squamous cell carcinomas, *Arch. Geschwulstforsch.*, **52**, S. 283—292.
 281. *Syrjänen K. J., Syrjänen S. M.* (1981). Histological evidence for the presence of condylomatous epithelial lesions in association with laryngeal squamous cell carcinoma, *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, **43**, 181—194.
 282. *Taub R., Kirsch I., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S., Leder P.* (1982). Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7837—7841.
 283. *Tjian R., Fey G., Graessmann A.* (1978). Biological activity of purified simian virus 40 T antigen proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1279—1283.
 284. *Tjian R., Robbins A., Clark R.* (1980). Catalytic properties of the SV40 large T-antigen, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 103—111.
 285. *Tooze J., ed.* (1981). *Molecular Biology of Tumor Viruses, Part 2, DNA Tumor Viruses*, 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 286. *Topp W. C., Lane D., Pollack R.* (1981). Transformation by simian virus 40 and polyoma virus. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses. Part 2: DNA Tumor Viruses*, 2d ed., edited by J. Tooze, pp. 205—296, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 287. *Treisman R., Green M. R., Maniatis T.* (1983). *Cis-* and *trans-*activation of globin gene transcription in transient assays, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7428—7432.
 288. *Treisman R. H., Novak U., Favaloro J., Kamen R.* (1981). Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle T protein, *Nature (Lond.)*, **292**, 595—600.
 289. *Trentin J. J., Yabe Y., Taylor G.* (1962). The guest for human cancer viruses, *Science*, **137**, 835—841.
 290. *Underwood P. B. Jr., Hester L. L. Jr.* (1971). Diagnosis and treatment of premalignant lesions of the vulva: A review, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **110**, 849—857.
 291. *van den Elsen P., Houweling A., van der Eb A.* (1983). Expression of region Elb of human adenoviruses in the absence of region Ela is not sufficient for complete transformation, *Virology*, **128**, 377—390.
 292. *van den Elsen P., de Pater S., Houweling A., van der Veer J., van der Eb A. J.* (1982). The relationship between region Ela and Elb of human adenoviruses in cell transformation, *Gene*, **18**, 175—185.
 293. *van der Eb A. J., Mulder C., Graham F. L., Houweling A.* (1977). Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. I. Isolation of specific fragment with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA, *Gene*, **2**, 115—132.
 294. *van Ormondt H., Maat J., De Waard A., van der Eb A. J.* (1978). The nucleotide sequence of the transforming *HpaI*-E fragment of adenovirus type 5 DNA, *Gene*, **4**, 309—328.
 295. *Vogt M., Dulbecco R.* (1960). Virus-cell interaction with a tumor-producing virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 365—370.
 - 295a. *Vonka V., Kanka J., Jelinek J., Subrt I., Suchanek A., Havrankova A., Vachal M., Hirsch I., Domorazkova E., Zavadova H., Richterova V., Naprstkova J., Dvorakova V., Svoboda B.* (1984). Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. I. Epidemiological characteristics, *Int. J. Cancer*, **33**, 49—60.

296. Wettstein F. O., Stevens J. G. (1981). Transcription of the viral genome in papillomas and carcinomas induced by the Shope virus, *Virology*, **109**, 448—451.
297. Wettstein F. O., Stevens J. G. (1982). Variable-sized free episomes of Shope papilloma virus DNA are present in all non-virus producing neoplasms and integrated episomes are detected in some, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 790—794.
298. Wold W. S. M., Green M. (1979). Adenovirus type 2 early polypeptides immunoprecipitated by antisera to five lines of adenovirus-transformed rat cells, *J. Virol.*, **30**, 297—310.
299. Wold W. S. M., Mackey J. K., Rigden P., Green M. (1979). Analysis of human cancer DNAs for DNA sequences of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B, *Cancer Res.*, **39**, 3479—3484.
300. Wold W. S. M., Mackey J. K., Brackmann K. H., Takemori N., Rigden P., Green M. (1978). Analysis of human tumors and human malignant cell lines for BK virus specific DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 454—458.
301. Woodruff J. D., Braun L., Cavalieri R., Gupta P., Pass F., Shah K. (1981). Immunological identification of papillomavirus antigen in paraffin-processed condyloma tissues from the female genital tract, *Obstet. Gynecol.*, **56**, 727—732.
302. Yasue H., Ishibashi M., Fujinaga K. (1980). The oncogenicity of avian adenoviruses, *Virology*, **106**, 361—373.
303. Yee S.-P., Rowe D. T., Tremblay M. L., McDermott M., Branton P. E. (1983). Identification of human adenovirus early region 1 products by using antisera against synthetic peptides corresponding to the predicted carboxy termini, *J. Virol.*, **46**, 1003—1013.
304. Yoshida K., Fujinaga K. (1980). Unique species of mRNA from adenovirus type 7 early region 1 in cells transformed by adenovirus type 7 DNA fragment, *J. Virol.*, **36**, 337—352.
305. Yoshida K., Sekikawa K., Fujinaga K. (1979). Mappings of adenovirus type 7 cytoplasmic RNA species synthesized early in lytically infected cells and synthesized in transformed cells, *J. Virol.*, **32**, 339—344.
306. Zachow K. R., Ostrow R. S., Bender M., Watts S., Okagaki T., Pass F., Faras A. J. (1982). Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias, *Nature (Lond.)*, **300**, 771—773.
307. Zinn K., DiMaio D., Maniatis T. (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene, *Cell*, **34**, 865—879.
308. Zinn K., Mellon P., Ptashne M., Maniatis T. (1982). Regulated expression of an extrachromosomal human β -interferon gene in mouse cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4897—4901.
309. zur Hausen H. (1976). Condyloma acuminata and human genital cancer, *Cancer Res.*, **36**, 794.
310. zur Hausen H. (1982). Human genital cancer: Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet*, **18**, 1370—1372.
311. zur Hausen H., Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G. W. (1974). Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus, *Int. J. Cancer*, **13**, 650—656.

Трансформация и онкогенез: ретровирусы

Дуглас Р. Лоуи¹

Введение

Ретровирусы часто вызывают разнообразные неопластические заболевания и широко распространены среди позвоночных [68]. Они отличаются характерной морфологией, структурой РНК-генома и наличием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы, ревертазы). В это семейство входят вирус саркомы Рауса (RSV), вирус миелоцитоматоза (MC29), вирусы саркомы мышей Харви (Ha-MuSV) и Молони (Mo-MuSV), вирус лейкоза птиц (ALV), вирус ретикулоэндотелиоза птиц (REV), вирус лейкоза мышей (MuLV), вирус опухолей молочных желез мышей (MMTV), вирус Т-клеточного лейкоза человека (HTLV). Все онкогенные РНК-содержащие вирусы относятся к ретровирусам, но не все ретровирусы онкогенны или хотя бы патогенны.

Ретровирусы интенсивно изучали и как вероятную причину возникновения опухолей человека и животных, и как модель вирусного канцерогенеза. Геномы всех хорошо изученных ретровирусов клонированы начиная с 1979 г. Для многих из них известны полные нуклеотидные последовательности [79, 155, 158, 165, 186]. Детальные знания структуры, а также доступность инфекционных рекомбинантных клонов позволили конструировать разнообразные мутантные и рекомбинантные вирусы *in vitro*. Использование этих подходов в сочетании с другими ранее разработанными методами позволило углубить представления о биологии ретровирусов. В этой главе мы рассмотрим жизненный цикл этих вирусов и суммируем сведения, касающиеся отдельных аспектов их биологии и онкогенного потенциала. Читатели, заинтересованные в более детальном знакомстве с ретровирусами, могут воспользоваться опубликованными монографиями [169, 200].

¹ Douglas R. Lowy, Laboratory of Cellular Oncology, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20205.

Первые изоляты ретровирусов

Первые представители этого семейства вирусов были выявлены по их способности вызывать опухоли у чувствительных животных [59, 68]. Ретровирусы были первыми из обнаруженных инфекционных онкогенных агентов. Выделение первого ретровируса описано Эллерманом и Бангом в 1908 г. [46]. Этим датским исследователям удалось перенести одну из форм лейкоза кур от зараженных к незараженным животным с помощью бесклеточного фильтрата лейкозных клеток. Однако открытие первого онкогенного вируса не было признано, поскольку в то время еще не было ясно, является ли лейкоз неопластическим заболеванием. Первым признанным онкогенным вирусом оказался фильтрующий агент, выделенный из спонтанной саркомы кур (RSV). Пейтон Раус получил его в 1911 г. [147] и показал, что он способен вызывать саркомы у зараженных цыплят. RSV изучен наиболее подробно из всех ретровирусов; именно для него были сформулированы многие принципы, которые оказались применимы к остальным ретровирусам. Вслед за Раусом другие исследователи обнаружили онкогенные ретровирусы млекопитающих, в частности фактор молока — MMTV, вызывающий карциному молочных желез у мышей [10], и MuLV, вызывающий мышинные лимфомы и лейкозы [67]. Разработанные методы обнаружения инфекционных RSV, MuLV и многих других ретровирусов *in vitro* позволили проводить количественные исследования на клеточных культурах [148, 150, 199].

Необычные свойства ретровирусов

Ретровирусы обладают рядом необычных свойств. В то время как многие другие вирусы убивают зараженную клетку, ретровирусы, как правило, вызывают хроническую инфекцию чувствительных клеток. Продолжительная экспрессия вирусных генов обычно не сопровождается цитотоксическим эффектом, поскольку большинство ретровирусов не вызывает гибель клетки. При ретровирусной инфекции либо усиливается клеточная пролиферация, либо не обнаруживается никаких изменений характера роста клеток.

Для достижения хронической инфекции геном этого семейства вирусов осуществляет уникальную стратегию репликации. Хотя вирусный геном в составе вириона представлен одноцепочечной РНК, в ходе его репликации в клетке он проходит стадию двухцепочечной ДНК, которая эффективно интегрирует с геномом хозяйской клетки. Превращение генома ретровируса из вирионной РНК в ДНК осуществляет вирусная РНК-зависимая ДНК-полимераза (ревертаза).

Независимое открытие в 1970 г. Темином и Мицутани [183] и Балтимором [7] в составе ретровирусов фермента, осуществляющего синтез ДНК на матрице РНК, объяснило, каким образом геном ретровируса сохраняется в зараженной клетке. Их важнейшее наблюдение, согласно которому возможна передача генетической информации от РНК к ДНК, а не только от ДНК к РНК, как думали раньше, заложило основополагающий теоретический фундамент для дальнейших исследований ретровирусов. Эти исследования привели к взрывному накоплению сведений о репликации и молекулярной биологии ретровирусов. Название «ретровирус» отражает присутствие у всех представителей этого семейства ревертазы и наличие стадии ДНК в цикле репликации их генома. Как сейчас известно, есть и другие вирусы, использующие в своей репликации ревертазу [136, 171].

Предположение о наличии в цикле репликации ретровирусов стадии ДНК (провирусная гипотеза) высказывалось еще до открытия ревертазы [181]. Оно основывалось на наблюдении, что ретровирусная инфекция подавляется ингибиторами синтеза ДНК (например, цитозинарабинозидом) и ДНК-зависимого синтеза РНК (такими как актиномицин D) [6, 180]. Прямые свидетельства в пользу ДНК-провирусной гипотезы были получены, когда в зараженных ретровирусами клетках обнаружили вирус-специфическую ДНК и когда была показана инфекционность (в опытах по трансфекции) ДНК, выделенной из этих клеток [80]. Ключевая роль ревертазы в синтезе ретровирусной ДНК была доказана после выделения и изучения условно-летальных (температурочувствительных) и летальных мутантов по гену ревертазы [194].

Еще одно необычное свойство ретровирусов, также связанное с особенностями их репликации, — это существование некоторых из них в форме клеточных генов — эндогенных провирусов, которые интегрированы с ДНК клеток зародышевой линии и передаются вертикально по Менделю от родителей потомству [25, 67, 86, 148]. Другие ретровирусы распространяются горизонтально, как большинство инфекционных агентов, например, вирус, ассоциированный, как недавно установлено, с одной из форм Т-клеточной лимфомы человека [142].

Некоторые ретровирусы (такие как RSV, Ha-MuSV, Mo-MuSV) содержат гены, очень близкие высококонсервативным клеточным генам. Хотя эти гены и не нужны для вирусной репликации, каждый из них сообщает вирусу способность вызывать трансформацию клеток в культуре и заметно повышает онкогенный потенциал вируса. (В этой главе термин «трансформация» означает приобретение клеткой *in vitro* неопластического фенотипа.) Поэтому эти гены названы вирусными трансформирующими генами, или онкогенами (сокращенно *v-onc*). Соответ-

ствующие им клеточные гены обозначают *c-onc*. Каждому из онкогенов присвоено трехбуквенное обозначение (например, *src*, *ras* и т. д.) [27]. Детальное сравнение вирусных и клеточных онкогенов показало, что вирусы переносят клеточные гены *c-onc*, несколько измененные и поставленные под контроль вирусных регуляторных элементов [9, 101]. Изучение онкогенсодержащих ретровирусов привело к идентификации клеточных онкогенов человека и многих видов эукариот. Измененная экспрессия генов *c-onc* вносит свой вклад в патогенез разнообразных злокачественных опухолей человека и животных.

Необходимо отметить, что большинство ретровирусов (таких как ALV, MuLV, HTLV) несут лишь гены, необходимые для репликации, и не содержат явных онкогенов. За исключением HTLV, эти вирусы не вызывают морфологической трансформации клеток в культуре; в тех случаях, когда они онкогенны для животных, опухоли, как правило, возникают после длительного латентного периода.

Структура вириона

Вирионы разных ретровирусов сходны по морфологии [178]. Они имеют диаметр 80—130 нм и содержат внутренний электроплотный нуклеоид (сердцевина), который окружен наружной оболочкой, представляющей собой липидсодержащую мембрану. Нуклеоид состоит из рибонуклеопротеина, окруженного икосаэдрическим белковым капсидом. Между капсидом и оболочкой находится внутренний белок, покрывающий нуклеоид. Наружная поверхность оболочки несет гликопротеиновые выросты (шипы с «булавами» на вершине), особенно выраженные у некоторых ретровирусов [13]. Вирусная оболочка образуется при почковании вирусов от плазматической мембраны клетки хозяина.

В дополнение к морфологическому сходству вирионы ретровирусов имеют много общих физических, химических и ферментативных свойств. Они состоят из 60—70% белка, 30—40% липидов, 2—4% углеводов и 1% РНК; их плавающая плотность составляет от 1,16 до 1,18 г/мл. Они чрезвычайно чувствительны к гидрофобным растворителям, детергентам и повышенной температуре (56 °C, 30 мин). Помимо структурных белков, в состав вирионов ретровирусов входит ревертаза.

Вирусный геном состоит из двух идентичных одноцепочечных позитивных молекул РНК, несущих кэп на 5'- и poly(A) на 3'-конце (как и большинство зрелых клеточных мРНК [26]). Две цепи РНК нековалентно связаны друг с другом вблизи 5'-концов. Длина каждой из них от 3,5 до 9 kb в зависимости от вида

вируса. Клеточная тРНК, специфичная для конкретного вируса и необходимая для вирусной репликации, нековалентно связана с 5'-концом вирусной РНК [176]. Наличие двух одинаковых цепей вирусной РНК в вирионе означает, что у ретровирусов диплоидный геном. Хотя функциональная роль такой организации генома точно не известна, не исключено, что образование гетерозиготных частиц при смешанной инфекции может быть механизмом создания генетического разнообразия за счет рекомбинации.

Классификация

Подсемейства

Ретровирусы широко распространены в природе [178]. Они найдены у многих позвоночных от птиц до человека. Есть также сведения о ретровирусах беспозвоночных [162]. Ретровирусы подразделяют на три неравных подсемейства: онковирусы (от *oncos* — опухоль), лентивирусы (*lente* — медленный) и спумавирусы (*spuma* — пена).

Спумавирусы исходно обнаружены как инфекционные загрязнения первичных клеточных культур [84]. Они получили свое название (пенящие вирусы) из-за вызываемой ими характерной «пенной» дегенерации культуры. Спумавирусы выявлены у разных представителей млекопитающих, включая кошек, коров, приматов и человека. Они могут вызывать хроническую инфекцию, но их пока не удалось связать с какими-либо известными патологиями.

Два наиболее изученных лентивируса — вирусы висны и мэди — представляют собой два близкородственных вируса овец [69]. Они вызывают прогрессирующие неврологические изменения (висна) и хроническую пневмонию (мэди) после исключительно продолжительных латентных периодов. Сигурдссон [166] назвал эти заболевания медленной вирусной инфекцией за длительность инкубационного периода и хронический характер заболеваний. У овец и коз найдены и другие близкородственные им вирусы.

Онковирусы представляют наиболее многочисленное подсемейство ретровирусов (табл. 13.1). Они найдены у всех позвоночных, у которых их искали, включая человека. Все последующие разделы глав посвящены онковирусам, поскольку именно они изучены наиболее детально. Обычно вирусы, относящиеся к этому подсемейству, делят по их принадлежности к виду-хозяину и по морфологии вирионов (А, В, С или D-тип; см. ниже). Внутри этих широких групп классификация идет по спектру хозяев, характеру интерференции, генетическим признакам, ан-

Таблица 13.1. Некоторые хорошо изученные онковирусы ¹

Название вируса	Источник вируса	Тип морфологии вируса	Экзогенный	Эндогенный	У-опс	Вид опухоли	Другие заболевания
Вирус лейкоза птиц (ALV)	Курица	С	Некоторые Да	Некоторые Нет	Нет	Лимфома Лейкоз Саркома	Анемия, остеопетроз
Вирус саркомы птиц (ASV) (Рауса, Y73, UR II, Фуд-жинами)	»	»	»	Нет	Да	Саркома	
Вирус эритроblastоза птиц (AEV)	»	»	»	»	»	Эритроblastоз	
Вирус ретикулоэндотелиоза (REV)	Птицы	»	»	»	Нет ²	Лимфома	Разнообразные
Цистернавирусы	Мышь, хомячок, морская свинка	А	Нет	Да	»	?	
Вирус опухолей молочных желез мышей (MMTV)	Мышь	В	Некоторые	Некоторые	»	Опухоли молочных желез	
Вирусы лейкоза мышей (MuLV) (AKR, Молони, Френд)	»	С	»	»	»	Лимфома/лейкоз, эритроblastоз	Неврологические
Вирусы саркомы мышей (MuSV) (шт. Молони, Харви, Кирстен, Balb, FBV, Абельсон)	Мышь, крыса	»	Да	Нет	Да	Саркома, эритроblastоз	
Вирусы лейкоза кошек (FeLV) (типы А, В, С)	Кошка	»	Некоторые	Некоторые	Нет	Лейкозы	
Вирусы саркомы кошек (FeSV) (шт. Снайдер — Тейлен, Гарднер — Арнштейн, Мак-Донау)	»	»	Да	Нет	Да	Саркома	
Вирус бычьего лейкоза (BLV)	Крупный рогатый скот	»	»	»	Нет	Лейкоз	
Эндогенный вирус павианов (BEV)	Павиан	»	Нет	Да	»	Не вызывает	

Вirus лейкоза (GALV)	гиббонов	Гиббон	»	Да	Нет	»	Лейкоз
Вirus саркомы обезьян (SSV)	Шерстистая обезьяна	Человек	»	»	»	Да	Саркома
Вirus Т-клеточного лейкоза человека (HTLV)	Человек	Макак-резус	»	»	»	Нет	Лимфома/лейкоз
Вirus обезьян Мезон—Пфайзера (MPMV)	Макак-резус	Беличья обезьяна	D	»	»	»	Не вызывает
Вirus беличьей (SMV)	Беличья обезьяна		»	Нет	Да	»	»

¹ Из [178] с некоторыми изменениями.
² REV-T — рекомбинант REV, содержащий онкоген *rel*.

тигенному родству, способу передачи и патогенности. Несмотря на свое название, многие онковирусы не вызывают заболеваний *in vivo*.

Принадлежность к виду-хозяину

Онковирусы удобно объединять по видам-хозяевам [178]. Наиболее подробно изучены вирусы птиц и мышей. Поскольку вирусы саркомы птиц произошли из ALV, их часто объединяют в группу саркомо-лейкозных вирусов (ASLV). Вирусы ретикулоэндотелиоза (REV) составляют вторую группу вирусов птиц С-типа; структурно они ближе к ретровирусам млекопитающих, чем к ASLV. MuSV происходят от MuLV и их часто объединяют. Вирусы млекопитающих ближе друг к другу, чем к ASLV. Несмотря на широкое распространение онковирусов, каждый конкретный ретровирус выделяют из животного конкретного вида, хотя и описаны случаи межвидового переноса вируса [184]. Эта видоспецифичность характерна и для тех ретровирусов, которые в экспериментальных условиях могут заражать организмы разных видов. Исследования гомологии нуклеиновых кислот и белков показывают, что обычно два ретровируса, выделенные от животных одного вида, оказываются ближе друг к другу, чем к вирусам животных других видов.

Морфология и морфогенез вирионов

Вслед за принадлежностью к определенному виду-хозяину, ретровирусы классифицируют по их морфологии, выявляемой при электронно-микроскопических исследованиях. Различают 4 главных морфологических типа онковирусных частиц — от А

до D [53]. Подавляющее большинство онковирусов (таких как RSV, MuLV, или HTLV) имеют морфологию С-типа и их часто объединяют в группу вирусов С-типа. Формирование вирионов этого класса заканчивается только после почкования от плазматической мембраны. Зрелые внеклеточные частицы С-типа имеют диаметр 80—110 нм; их нуклеокапсид расположен в центре вириона. MMTV — пример вирусов В-типа. Их внутренняя сердцевина формируется в цитоплазме и заключается в мембрану при почковании. Зрелые частицы, имеющие 125 нм в диаметре, содержат асимметрично расположенную электроноплотную сердцевину. Несколько вирусов приматов отнесены к D-типу. Подобно тому, как это происходит у вирусов В-типа, их сердцевина формируется в цитоплазме, хотя по морфологии зрелые вирионы напоминают вирусы С-типа, с которыми они более близки и генетически [41].

Частицы А-типа неинфекционны и обнаруживаются только внутри клеток. Они отличаются отсутствием липидсодержащей оболочки, поскольку не почкуются от мембраны. Есть 2 типа А-частиц — интрацистернальные и интрацитоплазматические. Первые представляют собой продукты экспрессии эндогенных вирусных геномов, дефектных по репликации [98]. Их биология изучена недостаточно, хотя известно, что они экспрессируются в раннем эмбриогенезе и могут внедряться в новые участки хозяйской ДНК [99]. Интрацистернальные А-частицы обнаружены лишь у мышей и еще нескольких видов млекопитающих. Что касается внутрицитоплазматических А-частиц, то по крайней мере некоторые из них — предшественники вирионов В- и D-типа. Ниже в основном будут обсуждаться данные, касающиеся ретровирусов С-типа, поскольку они изучены наиболее полно.

Генетический состав

Структура и генетический состав ретровирусов просты [26, 109, 194]. Тем не менее они различаются по числу и виду своих генов. Генетический состав каждого вируса является основой его биологии и классификации. Ретровирусы содержат не более 4 генов (кодирующих белок доменов). Эти гены подразделяют на гены, необходимые для репликации вируса, и вирусные онкогены (*v-onc*), определяющие высокую онкогенность вируса, но не участвующие в репликации.

Гены репликации

Для репликации ретровируса нужны всего 3 гена: *gag* (назван так, поскольку определяет группоспецифический антиген, *group specific antigen*), кодирующий белки сердцевины; *pol*, ко-

дирующий обратную транскриптазу (*polymerase*), и *env*, кодирующий белки оболочки (*envelope*). Их взаимное расположение в геномах всех ретровирусов: *gag-pol-env* (от 5'- к 3'-концу РНК) (рис. 13.1). Вирусный геном содержит донорный сайт сплайсинга вблизи гена *gag* и акцепторный — непосредственно перед геном *env*. Продукт гена *env* синтезируется с субгеномной мРНК, представляющей собой продукт соединения этих сайтов. Продукты генов *gag* и *pol* считываются с мРНК, сходных с полноразмерными вирионными РНК.

MMTV и HTLV являются исключениями среди ретровирусов без онкогенов, поскольку имеют дополнительную открытую рамку считывания за геном *env* [158, 188, 201]. Ни для одного из вирусов не идентифицирован белок, кодируемый четвертым геном, хотя субгеномная мРНК, специфичная для этого гена, обнаружена в клетках, зараженных MMTV. MMTV и HTLV изучены недостаточно подробно, чтобы можно было обсуждать возможные функции предполагаемого белка.

Ретровирусные белки называют, исходя из размера, определяемого по их электрофоретической подвижности в ДСН-содержащем геле, типа модификации (фосфорилирование или гликозилирование) и кодирующего их гена [43, 70]. Например, *gag*-кодируемый белок с мол. массой 30 К называют р30^{gag}; фосфопротеин с мол. массой 12 К, также кодируемый геном *gag*, — рр12^{gag}, а гликопротеин с мол. массой 70 К, кодируемый геном *env*, — гр70^{env}. Все вирионные белки — продукты процессинга полипротеинов-предшественников, в обозначении которых присутствует приставка Рг (например, Рг76^{gag}).

Подавляющее большинство ретровирусов имеют полноценные гены *gag*, *pol* и *env* и не несут гена *v-onc*. Их обозначают как компетентные по репликации, но дефектные по трансформации (*v-onc*⁻, поскольку они не трансформируют зараженные клеточные культуры). Многие вирусы утратили один или более из трех своих генов и соответственно дефектны по репликации. Тем не менее их дефектные РНК-геномы могут «одеваться» недефектными белками, кодируемыми близкородственными вирусами [109, 150, 199]. Таким образом, вирионные белки могут поставляться со стороны. Однако, чтобы дефектный вирус мог существовать, необходимо, чтобы нетранслируемые области возле концов вирусной РНК оставались интактными: они необходимы для синтеза вирусной ДНК, контроля экспрессии РНК и ее эффективной упаковки.

Инкапсидацию дефектной РНК с образованием псевдотипов называют спасением вируса. Спасенный РНК-геном может заражать клетки и проходить почти весь цикл репликации (синтез вирусной ДНК, интеграция с геномом клетки и экспрессия), за исключением синтеза полного набора вирионных белков

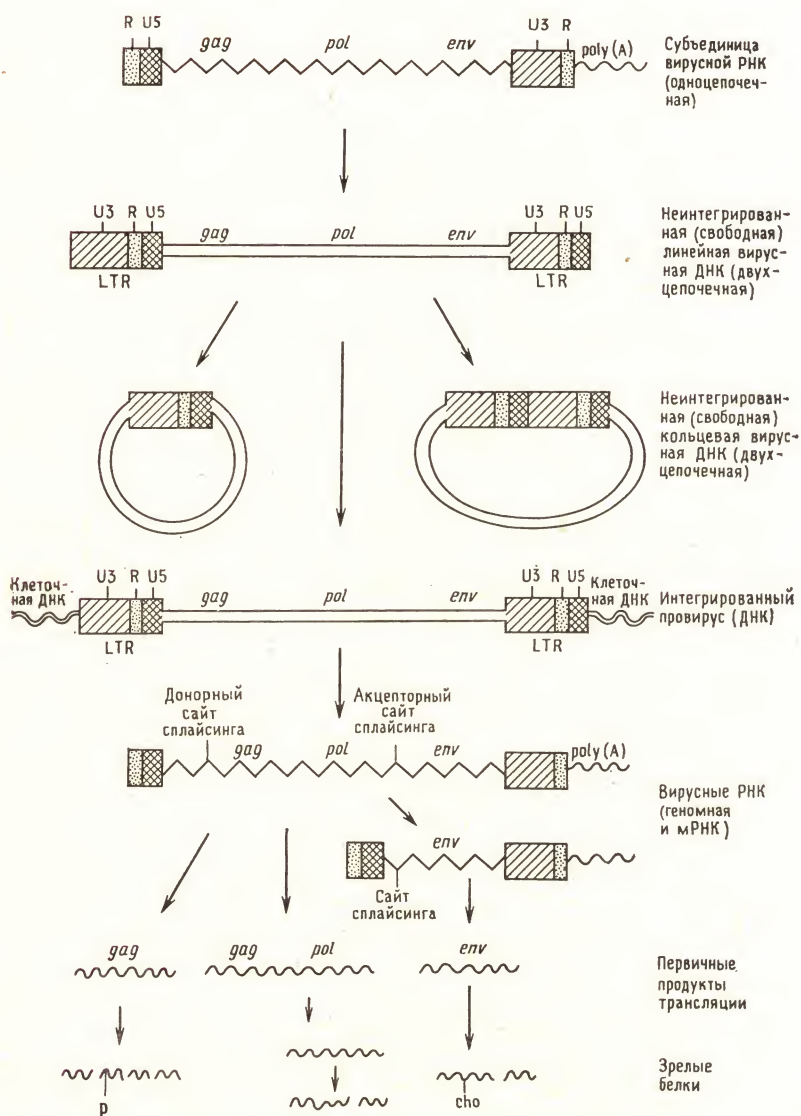


Рис. 13.1. Репликация ретровирусов и синтез вирусных белков.

(напомним, что вирус дефектен по одному или нескольким из своих генов). Если такая клетка не коинфицирована полноценным вирусом, то геном дефектного вируса будет экспрессироваться, но не сможет передаваться — такие клетки называют непродуцирующими. Иными словами, целостность вирусных генов *gag*, *pol* и *env* не является необходимым условием экспрессии провируса. Если непродуцирующую клетку заразить полноценным вирусом, то дефектный геном будет вновь спасен. Полноценный вирус, обеспечивающий инфекционность дефектного, называют *вирусом-помощником*. Полноценные ретровирусы называют еще *независимыми от помощника* (*helper-independent*), а дефектные — *зависимыми от помощника* (*helper-dependent*). В том случае, если дефектный вирус вызывает изменение клеточного фенотипа, которое не способен вызывать полноценный вирус, обеспечивающее клеткам селективные преимущества (например, трансформацию с помощью *v-onc*), устанавливается хроническая смешанная инфекция. Селективный признак будет способствовать сохранению дефектного вируса, а полноценный вирус будет обеспечивать перенос обоих геномов в незараженные клетки.

Гены *v-onc*

В связи с особой важностью генов *v-onc* их наличие или отсутствие в вирусном геноме используют в качестве критерия при классификации вируса. Почти все ретровирусы, способные вызывать трансформацию (*v-onc*-содержащие), дефектны по репликации. Их трансформирующая активность — ярко выраженный селективный маркер, поскольку клетки, зараженные *v-onc*-содержащим вирусом, перерастают нормальные.

Способные к трансформации, но дефектные по репликации вирусы всегда выделяются в виде смешанной популяции с полноценными, способными к репликации ретровирусами. Обычно собственно вирусные последовательности генома трансформирующего вируса (за исключением онкогена) происходят из того полноценного вируса, вместе с которым он исходно выделен. В ходе пассирования полноценный вирус или его дефектные *v-onc*-производные могут трансдуцировать гены *v-onc*, возникшие из их *c-onc*-предшественников. Хотя *v-onc* теоретически и может становиться четвертым геном полноценного ретровируса, обычно этого не происходит, возможно потому, что образующаяся при этом геномная РНК слишком велика, чтобы эффективно упаковываться в вирионы.

Единственное исключение из «правила дефектности» *v-onc*⁺ вирусов представляют собой отдельные изоляты RSV, сочетающие в себе способность к репликации и трансформации [9, 109,

194]. Но даже у RSV ген *v-onc* исходно был трансдуцирован дефектным вирусом [174]. Видимо, позже этот дефектный вирус рекомбинировал с вирусом-помощником, образовав реплицирующийся *v-onc*⁺-вирус. Его геном оказался на 1 kb длиннее, чем у других ретровирусов. Необычная способность этой длинной РНК к упаковке, вероятно, связана со 115-нуклеотидными повторами, фланкирующими *v-onc* RSV. Если эти повторы делетированы, то вирус становится неинфекционным из-за неспособности его РНК к упаковке [168]. Геном RSV, независимого от помощника, нестабилен: в потомстве такого вируса много частиц, дефектных либо по репликации, либо по трансформации из-за часто возникающих спонтанных делеций. Однако присутствие двух селективных маркеров в RSV — способности к репликации и способности к трансформации — позволило провести генетическое картирование каждой из функций, используя мутанты по одному из признаков [109, 194].

Большинство трансформирующих вирусов несут по одному гену *v-onc*, а некоторые — два [9, 109]. Вообще этот ген может быть локализован в разных частях вирусного генома. Например, онкоген RSV (*v-src*) расположен за геном *env*. Его продукт (pp60^{src}) транслируется со специальной субгеномной РНК — продукта сплайсинга полноразмерного транскрипта. При этом используется донорный сайт сплайсинга, расположенный возле 5'-конца РНК. Акцепторный сайт сплайсинга находится перед *src*-кодирующими последовательностями и происходит из клеточного гена *c-src* [172]. У Mo-MuSV ген *v-mos* заместил ген *env* и использует его акцепторный сайт сплайсинга. Поэтому его продукт считывается с субгеномной РНК, возникающей при сплайсинге по обычным донорному и акцепторному сайтам вирусной РНК [186]. Наиболее типична структура *v-onc* птичьего вируса MC29: его онкоген «слит» с геном *gag* в общую открытую рамку трансляции; в результате биосинтеза белка образуется «слитный» продукт, состоящий из N-концевой части, кодируемой геном *gag*, и *v-onc*-кодируемой части. Вирус эритробластоэза птиц (AEV) содержит 2 онкогена [66]. Один из них — *erbA* — типичный слитный ген *gag-onc*. Второй — *erbB* — расположен дальше по ходу транскрипции и считывается с субгеномной мРНК. Онкоген *ras*^H вируса Ha-MuSV внедрен в ген *gag*, однако его белковый продукт не несет кодируемых геном *gag* аминокислот [20]. За исключением недефектного RSV, ни один из онкогенсодержащих ретровирусов не способен синтезировать полноценный продукт гена *env*. Некоторые из изолятов Mo-MuSV синтезируют функционально активные продукты генов *gag* и *pol*. Другие варианты Mo-MuSV имеют делеции в этих генах, не существенных для реализации трансформирующей активности онкогена *mos* ретровируса.

Следует отметить, что ретровирусы можно использовать в качестве векторов для переноса селективных генных маркеров. Если такой ген окружен дис-действующими регуляторными элементами, то он может быть спасен и перенесен подобно *v-onc*-содержащим ретровирусам, дефектным по репликации. Эту способность можно использовать в будущем для переноса генов в клетки в терапевтических целях. Такого рода трансмиссивный агент уже был получен на основе клонированных ретровирусных последовательностей и гена тимидинкиназы [164, 198].

Спектр хозяев

Для большинства ретровирусов характерна высокая специфичность по отношению к клеткам-хозяевам [199]. Спектр хозяев представляет собой важный признак для классификации вирусов. Известны по крайней мере 3 зависящих от хозяина механизма, которые могут препятствовать репликации вируса: 1) отсутствие рецепторов на поверхности клетки, необходимых для прикрепления вируса (нет заражения); 2) неспособность вирусного генома сохраниться в клетке после проникновения и обратной транскрипции (абортная инфекция) и, наконец, 3) невозможность сборки инфекционных вирионов, несмотря на экспрессию интегрированной провирусной ДНК (непермиссивная инфекция).

Попадание ретровируса в клетку-хозяина осуществляется в результате специфического взаимодействия между поверхностным вирусным гликопротеином и рецептором клеточной поверхности [37]. Ретровирусные гликопротеины полиморфны, и вирусы, несущие разные гликопротеины, используют разные клеточные рецепторы. Клетки, не имеющие соответствующего рецептора, не могут быть заражены ретровирусом. Специфичное взаимодействие вирус — клетка обуславливает чувствительность или устойчивость хозяина к заражению и служит важным критерием при классификации ретровирусов. Некоторые из них могут заражать клетки разных видов животных, поскольку используемые ими рецепторы широко распространены и эволюционно консервативны, в то время как спектр хозяев других вирусов строго ограничен более редкими клеточными рецепторами.

В соответствии со способностью заражать определенных хозяев ретровирусы обычно делят на 3 основные группы: экотропные (есо — дом), реплицирующиеся в клетках вида-хозяина и близкородственных видов; ксенотропные (хепо — чужеродный), размножающиеся только в клетках, не принадлежащих к «родительскому виду», и амфотропные (ampho — двойной), реплицирующиеся как в клетках природного хозяина (родительских клетках), так и других видов. Заметим, что 2 вируса с идентич-

ным спектром хозяев могут теоретически обладать разными *env*-кодированными гликопротеинами и попадать в клетку, используя разные рецепторы. Эту возможность, в некоторых случаях реализующуюся, проще всего проверить по способности этих двух вирусов к интерференции (см. следующий раздел).

Хотя биохимически рецепторы клеток-хозяев еще не охарактеризованы, уже изучены их некоторые генетические аспекты. Чувствительность к вирусной инфекции — доминантный признак. Определена хромосомная локализация некоторых генов рецепторов; большинство из них картировано в разных хромосомах. Это показывает, что они не являются аллелями одного гена [96, 199]. Данный факт согласуется с наблюдениями, показывающими, что одни и те же клетки могут быть заражены ретровирусами, несущими совершенно разные поверхностные гликопротеины. Пять рецепторных локусов выявлены у кур (от А до Е). Вирусы птичьих лейкозов и сарком (ASLV) разделяют на подгруппы от А до Е в соответствии с их гликопротеинами. Птицы генетически различаются по тому, какие типы рецепторов они имеют. В отличие от них, мыши сходны по наборам ретровирусных рецепторов.

Мышиные клетки имеют еще и внутриклеточное ограничение репликации ретровирусов. Оно осуществляется с помощью неизвестного механизма, определяемого клеточным геном *Fv-1*, который может блокировать интеграцию вирусной ДНК [72, 107, 199]. Ген *Fv-1* — важный барьер распространения *in vivo* эндогенных экотропных вирусов мышей. Известны 2 аллеля этого гена — *Fv-1ⁿ* и *Fv-1^b*. MuLV разделяют по их способности реплицироваться в клетках *Fv-1ⁿⁿ* и *Fv-1^{bb}*. Говорят, что вирус N-тропный, если клетки *Fv-1ⁿⁿ* перmissive, а клетки *Fv-1^{bb}* — нет, что вирус В-тропный — в обратном случае и что вирус NB-тропный, если перmissive для вируса клетки обоих типов. N-, В-или NB-тропность вируса зависит от двух аминокислот в главном *gag*-кодированном структурном вирусном белке р30 [38, 129]. Клетки, имеющие генотип *Fv-1^{nb}*, резистентны и к N-, и к В-тропным вирусам, но чувствительны к NB-тропным. Следовательно, запрещение инфекции — доминантный признак. Пока неизвестно как именно взаимодействие между продуктом гена *Fv-1* и вирусным белком препятствует заражению.

Третий вид устойчивости клеток-хозяина к вирусному заражению проявляется в клетках млекопитающих, зараженных определенными вирусами птиц (после того как вирус преодолел поверхностный барьер) [199]. Несмотря на то что в этих клетках птичьих вирусы способны осуществить большинство стадий своего репликативного цикла, включая интеграцию и экспрессию своих генов, сборки вирионов не происходит. Следовательно, клетки млекопитающих неперmissive для вирусов птиц. Воз-

можно, для правильной сборки вирус нуждается в неких хозяйских факторах, отсутствующих в клетках млекопитающих. Подобный механизм хозяйского ограничения не обнаружен в системе «ретровирус млекопитающих — клетки млекопитающих».

Вирусная интерференция

Клетки, продуцирующие ретровирус, становятся устойчивыми к последующему заражению этим же вирусом или другим, но использующим те же клеточные рецепторы для проникновения в клетку [199]. Это явление называют *вирусной интерференцией*. Вторичного заражения не происходит потому, что синтезированные в клетке вирусные поверхностные гликопротеины блокируют специфические клеточные рецепторы. Поскольку этот вид резистентности зависит от клеточных рецепторов, вирусы, связывающиеся с другими рецепторами, легко заражают уже зараженные клетки. Поэтому вирусная интерференция служит отличным тестом при определении и классификации гликопротеина данного вируса.

Интерференция позволяет также определять, используют ли два вируса с одинаковой тропностью (экотропные и т. д.) одни и те же или разные клеточные рецепторы. Именно благодаря использованию этого теста выяснено, что амфотропные MuLV подразделяются на два класса: собственно амфотропные вирусы и вирусы, называемые MCF (от англ. mink cell focus-forming — образующие фокусы на клетках норки) [73]. Вирусная интерференция показала, что экотропные, ксенотропные, амфотропные и MCF-вирусы входят в клетку через разные рецепторы [141]. Эти данные согласуются с результатами анализа гена *env* другими методами. Например, сыворотка, нейтрализующая вирусы одного класса, обычно избирательно нейтрализует другие вирусы того же класса. Кроме того, и сами гены *env* и их продукты более сходны у вирусов одного класса [22, 26].

Распространение ретровирусов

Многие ретровирусы распространяются путем горизонтальной инфекции [178] и называются экзогенными. Все *v-onc⁺*-вирусы экзогенны, хотя большинство экзогенных вирусов — это *v-onc⁻*-вирусы. Ретровирусы, передающиеся экзогенно, либо экотропны, либо амфотропны по спектру своих хозяев.

Однако некоторые ретровирусы распространяются вертикально в виде наследуемых провирусов, локализованных в различных хромосомах [25]. Эти провирусы и кодируемые ими вирусы называют эндогенными. По своему спектру хозяев эндогенные вирусы обычно экотропны или ксенотропны. Их продукция может быть активирована спонтанно либо в эксперименте обработкой

клеток галогенпроизводными пиримидинов [110] или другими индукторами [137]. В природных условиях большинство эндогенных вирусов мало патогенны ввиду низкой инфекционности и устойчивости хозяев к заражению. У мышей есть ДНК эндогенных вирусов А-, В- и С-типа. В геноме человека содержится по крайней мере два разных класса эндогенных (предположительно С-типа) вирусных геномов [14, 114]¹. У человека пока не было обнаружено биологической активности эндогенных вирусов. Многие эндогенные вирусы дефектны, поскольку имеют единичные или множественные геномные повреждения. Как отмечено выше, провирусы А-типа — это пример геномов эндогенных вирусов, дефектных по межклеточной передаче, но способных к формированию внутриклеточных частиц. Эндогенные вирусы MuLV, кодирующие *env*-гликопротеины MCF, — другой пример явно дефектного элемента. Все обнаруженные MCF-вирусы, способные к репликации, являются результатом рекомбинации между недефектным ретровирусом и эндогенным *env*-геном MCF [22, 25]. Считается, что приобретение спектра хозяев, характерного для MCF, — важный этап канцерогенеза, связанного с заражением экотропным MuLV (более детальное обсуждение см. в разделе «Патогенность *v-onc*-вирусов»).

Введение к вирусной репликации

Репликативный цикл ретровирусов удобно разделить на 5 фаз: а) ранние события: адсорбция, проникновение и «разделение»; б) превращение вирусного РНК-генома в полноразмерную неинтегрированную линейную (свободную) ДНК; в) интеграция вирусной ДНК с хозяйским геномом; г) экспрессия генов интегрированной вирусной ДНК; д) синтез вирусных белков и сборка вирионов.

По сравнению с другими вирусами, у ретровирусов есть 3 необычных свойства репликации. Во-первых, вирус должен превратить свой РНК-геном в ДНК. Во-вторых, эта ДНК длиннее, чем вирусная РНК. Это удлинение обусловлено удвоением части последовательности вирусной РНК. Дуплицированные последовательности образуют длинные концевые повторы (LTR — long terminal repeat) вирусной ДНК [85, 160]. Само название указывает на то, что удвоенные последовательности расположены на концах провирусной ДНК. Размер LTR составляет от 0,3 до 1,4 kb в зависимости от вида вируса [26, 182]. Большинство последовательностей, образующих LTR, представлены в РНК лишь одной копией и расположены как на 5'-, так и на 3'-конце

¹ Сейчас обнаружено по крайней мере 7 различных классов эндогенных провирусов человека, в том числе родственных вирусам В-, С- и D-типов. — *Прим. перев.*

(рис. 13.1). Задача образования LTR на обоих концах ДНК решается путем осуществления ряда сложных взаимосвязанных событий (рис. 13.2). Третья необычная черта ретровирусной репликации — эффективная интеграция свободной ДНК с геномом клетки в строго определенной ориентации, которая зависит от концевых последовательностей обоих LTR.

Фаза I: ранние события

Об этой стадии вирусной инфекции известно сравнительно немного [189]. Ее исследования затруднены из-за низкой эффективности заражения (более 10 частиц на инфекционную дозу). Поскольку большинство частиц неинфекционно, с помощью биохимических и морфологических приемов можно проследить скорее путь деградации, а не репликации. Например, некоторые количества вирусной РНК обнаруживали в ядре клеток птиц через несколько минут после заражения [34]. В этом наблюдении, однако, мало биологического смысла, поскольку основной синтез вирусной ДНК на матрицах вирионной РНК идет в цитоплазме [192].

Выше отмечалось, что проникновению вирионов ретровирусов в клетки предшествует специфическое взаимодействие между поверхностным гликопротеином вируса и рецептором клетки-хозяина [37]. Сведения о способе попадания вириона внутрь клетки противоречивы: неясно, происходит ли проникновение непосредственно через плазматическую мембрану или путем эндоцитоза (виropексиса) [2, 34, 104, 120]. Часть вирионов деградирует в лизосомах, однако неизвестно, ведет ли этот путь к инфекции или гибели вируса. Так или иначе, на первых этапах заражения вирион переходит в новое состояние, когда он готов начать синтез вирусной ДНК. В какой степени происходит при этом «раздевание» вирионов, остается неясным.

Для MuLV процессы адсорбции и проникновения вирионов отличаются специфичностью и зависят от рецепторов [37, 189]. ASLV адсорбируются не столь специфично, но проникновение этих вирусов также зависит от рецепторов [125]. При этом связывание очищенного гликопротеина птичьих вирусов строго специфично в отношении рецептора. Частицы MuLV связываются с клеточной поверхностью с полупериодом (время связывания 50% частиц) 2 ч, а время их проникновения 3 ч. Связывание может идти при 4 °C, а проникновение зависит от температуры [2].

Фаза II: синтез неинтегрированной (свободной) вирусной ДНК

О большинстве стадий этой фазы ретровирусной репликации известно довольно много [189]. Главная задача этого этапа

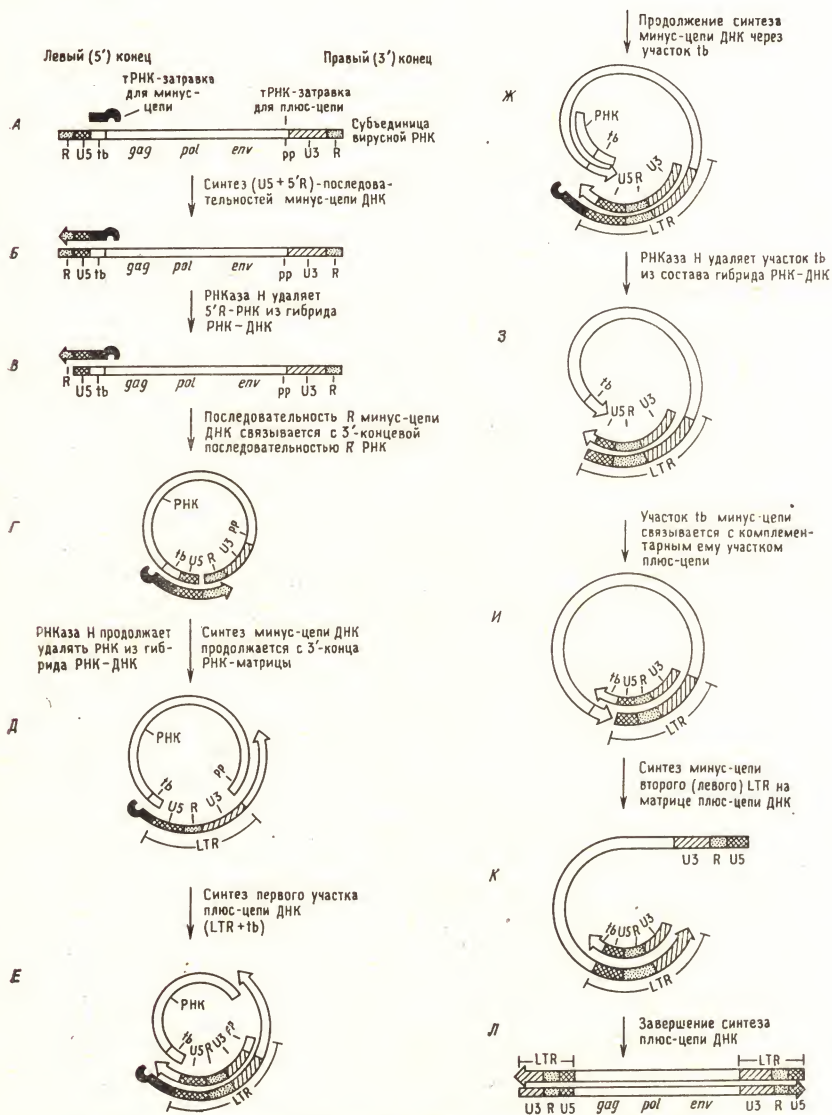


Рис. 13.2. Этапы репликации ретровирусного генома от РНК до свободной двухцепочечной линейной ДНК. *tb* — тРНК-связывающий участок и комплементарные ему последовательности; *pp* — положение затравки для синтеза плюс-цепи. Репликация показана для одной цепи РНК. В ходе элонгации минус-цепи вирусной ДНК может происходить однократная или многократная смена матриц — двух цепей вирионной РНК.

инфекции — превратить одноцепочечный РНК-геном в линейную двухцепочечную вирусную ДНК [61]. Синтез вирусной ДНК, который идет в цитоплазме и требует по крайней мере четырех часов [192], осуществляется обратной транскриптазой (ревертазой). В ходе этого процесса определенные последовательности, присутствующие в виде уникальных копий в РНК, должны быть дублированы, чтобы образовать LTR на обоих концах ДНК-продукта (рис. 13.1). Поэтому главными участниками второй фазы заражения являются ревертаза, последовательности на концах вирусной РНК и LTR. Прежде чем рассмотреть модель обратной транскрипции, будет уместно остановиться на продуктах гена *pol* и структуре вирусной РНК.

Обратная транскриптаза

Продукты гена *pol* (обычно называемые ревертазой) обладают по крайней мере тремя ферментативными активностями [60, 193]: ДНК-полимеразной, использующей в качестве матриц как РНК, так и ДНК [7, 183]; активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК — ДНК (но не одно- или двухцепочечную РНК) [121], и ДНК-эндонуклеазной активностью [60]. Первые две из них необходимы для синтеза свободной вирусной ДНК. Эндонуклеазная активность, вероятно, необходима для интеграции вирусной ДНК с геномом клетки-хозяина (S. Goff, личное сообщение).

Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц [189]. Каждый вирион содержит около 50 молекул ревертазы. Использование температурочувствительных и безусловно-летальных мутантов по гену *pol* показало, что присутствие ревертазы в вирионе есть необходимое условие инфекционности. Отсутствие ревертазы не может быть компенсировано дополнительным заражением вирусом дикого типа [194]. Выделенный из вирионов фермент состоит из двух субъединиц — альфа ($p65^{pol}$) и бета ($p95^{pol}$), присутствующих в эквимольном количестве. Альфа-субъединица представляет собой N-концевую часть (две трети) бета-субъединицы. Большая субъединица обладает всеми тремя активностями, в то время как меньшая — только полимеразной и активностью РНКазы Н. Эндонуклеазная активность обусловлена С-концевой частью бета-субъединицы, поскольку «отрезанный» от нее С-концевой пептид с мол. массой 32 кДа обладает этой активностью. Ревертаза MuLV выделена из вирионов в виде мономера, соответствующего меньшей альфа-субъединице ревертазы ретровирусов птиц. Эндонуклеазная активность, присутствующая в вирионах MuLV, вероятно, кодируется С-концевой частью гена *pol*.

Очищенная ревертаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах. Эта реакция нуждается в двухвалентных катионах (Mn^{2+} или Mg^{2+} в зависимости от вида вируса). Как и другим полимеразам, ревертазе, чтобы начать синтез, необходим короткий двухцепочечный участок (затравка). Затравкой может служить как РНК, так и ДНК, которые оказываются ковалентно связанными с новосинтезированной цепью ДНК. У ретровирусов затравкой для синтеза первой цепи ДНК служит определенная тРНК (триптофановая у RSV, пролиновая у MuLV и лизинная у MMTV), 3'-концевая часть которой связана с комплементарной ей последовательностью вблизи 5'-конца вирусной РНК [176]. Ревертаза специфично связывается с нужной тРНК, способствуя ее доставке к вирусной РНК [130]. В ходе синтеза ДНК фермент сравнительно часто ошибается [64], и многие возникающие провирусы оказываются неинфекционными, поскольку содержат точечные мутации [127].

На РНК-матрицах очищенный фермент обычно синтезирует одноцепочечную комплементарную ДНК (кДНК). Это позволяет использовать ревертазу при клонировании эукариотических мРНК [44], причем в качестве затравки применяют oligo(dT), комплементарный poly(A)-последовательности на 3'-конце мРНК. В подобных опытах используют также склонность ревертазы синтезировать вторую цепь ДНК с образованием самокомплементарной шпильки, когда фермент доходит до 5'-конца РНК-матрицы.

На вирусной РНК-матрице очищенный фермент способен синтезировать лишь короткий фрагмент одноцепочечной ДНК (strong-stop-ДНК, см. ниже) [75]. Однако в определенных условиях очищенные вирионы способны синтезировать полноразмерную инфекционную вирусную ДНК [146]. Скорость работы ревертазы *in vitro* заметно ниже, чем скорость работы других ДНК-полимераз [146, 189].

Вирусная РНКазы Н действует как экзонуклеаза, гидролизующая РНК в составе гибридов РНК—ДНК [60, 189]. Она гидролизует РНК в основном до олигомеров длиной 6—12 нуклеотидов, а не до отдельных нуклеотидов. Ниже будет показано, что удаление РНК из состава гибрида РНК—ДНК, предположительно осуществляемое РНКазой Н, — необходимое условие синтеза вирусной ДНК.

Эндонуклеазная активность ревертазы лучше всего проявляется на кольцевых ДНК, в которые она вносит одноцепочечные разрывы. С меньшей эффективностью ревертаза образует такие разрывы в линейной двухцепочечной ДНК и линейной одноцепочечной РНК или размыкает ковалентно замкнутую кольцевую ДНК.

Вирусная РНК

В первой фазе вирусной репликации непосредственно участвуют несколько областей вирусной РНК (рис. 13.1 и 13.2, 1) [26]. Каждый повтор LTR возникает из трех областей вирусной РНК: последовательностей R, U5 и U3. Последовательность R (от англ. *redundant* — избыточная) — это короткий участок (от 30 до 60 нуклеотидов), дважды присутствующий в составе РНК — на ее левом (5') и правом (3') концах [74, 156]. Poly (A)-участок, расположенный за 3'-концевой R-последовательностью и представляющий собой посттранскрипционную модификацию РНК, не участвует в синтезе вирусной ДНК. Последовательность R формирует внутренний участок LTR и играет важную роль на ранних стадиях синтеза ДНК. Следующие за R 80—120 нуклеотидов с 5'-конца РНК называют последовательностью U5. Эта последовательность, присутствующая в составе РНК в виде одной копии, дублируется при формировании LTR, где она находится за R-областью. Расположенная перед R последовательность U3 локализована на 3'-конце РНК и также дублируется в ходе синтеза ДНК. Из трех формирующих LTR фрагментов U3 наиболее вариабелен по длине (0,2—1,2 kb) и нуклеотидной последовательности [182].

18 нуклеотидов, примыкающих справа к U5 в вирусной РНК, служат участками связывания тРНК, используемой в качестве затравки при синтезе первой цепи ДНК. В вирионе эти 18 нуклеотидов спарены с 18 нуклеотидами 3'-конца тРНК. Короткий богатый пуринами участок (10—20 нуклеотидов), непосредственно предшествующий U3 в вирусной РНК, служит, как полагают, затравкой при инициации синтеза второй цепи ДНК [100, 119].

Синтез вирусной ДНК

Идущий *in vivo* синтез вирусной ДНК кратко изложен в настоящем абзаце и детально разобран в последующих, а также на рис. 13.2. Синтез вирусной ДНК начинается в течение первого часа после заражения с появлением одноцепочечной ДНК, комплементарной вирусной РНК. Это минус-цепь ДНК, поскольку вирусная РНК служит кодирующей плюс-цепью. Минус-цепь ДНК — единая и непрерывная молекула, хотя она и синтезируется в 3 этапа с трех различных матриц. Понимание смысла каждого из этих этапов и есть ключ к пониманию репликации ретровирусной ДНК. Напомним, что синтез минус-цепи ДНК идет справа налево относительно РНК, поскольку комплементарная цепь имеет противоположную полярность. Вместо того чтобы начаться у 3'-конца РНК, синтез ДНК начинается с

тРНК-затравки вблизи ее 5'-конца (рис. 13.2, А). На первом этапе синтезируется последовательность, комплементарная фрагментам R и U5, расположенным перед сайтом связывания тРНК-затравки (рис. 13.2, Б); эта последовательность, комплементарная самой левой части в РНК, окажется затем самой правой в вирусной ДНК. На втором этапе синтез минус-цепи ДНК продолжается на правом конце одной из двух вирионных РНК и идет влево через сайт связывания тРНК-затравки (tb) возле левого конца РНК (рис. 13.2, Д—13.2, Ж). На этих двух этапах образуется правый LTR путем соединения последовательностей, расположенных на левом и правом концах РНК, а также оставшаяся минус-цепь вирусной ДНК, за исключением левого LTR. На третьем этапе образуется левый LTR на матрице предварительно синтезированной плюс-цепи правого LTR (см. ниже, а также рис. 13.2, Е и 13.2, К).

Теперь рассмотрим каждый этап более детально. Итак, первым синтезируется фрагмент, который затем станет самой правой частью вирусной минус-цепи ДНК: он начинается с правого конца U5 и заканчивается у конца вирусной РНК — в левой части последовательности R (рис. 13.2, Б) [75]. Эта ДНК ковалентно связана с 3'-концом тРНК-затравки, расположенной у правой границы U5. Достигнув конца РНК-матрицы, синтез останавливается. Эта задержка синтеза наблюдается как *in vitro*, так и *in vivo*, за что первый фрагмент ДНК, включающий U5 и R, называют *strong-stop*-ДНК.

Чтобы продолжить синтез минус-цепи ДНК, ревертаза в комплексе со *strong-stop*-ДНК должна «перепрыгнуть» с левого на правый конец вирусной РНК. Этот «прыжок» обеспечивается последовательностью R, строго повторенной на концах РНК, а также активностью РНКазы Н ревертазы. РНКаза Н разрушает R-фрагмент РНК в составе гибрида РНК—ДНК (рис. 13.2, В), что позволяет освободившейся минус-цепи ДНК соединиться с комплементарной R-последовательностью на правом конце РНК (рис. 13.2, Г). Не вполне ясно, происходит ли этот «прыжок» на 3'-конец той же РНК, которая служила матрицей для синтеза *strong-stop*-ДНК, или второй молекулы вирионной РНК. Так или иначе, минус-цепь ДНК, содержащая лишь одну копию R-последовательности, теперь может быть продолжена от правого к левому концу вирионной РНК (рис. 13.2, Д).

Подготовка к третьему этапу (синтез минус-цепи левого повтора LTR) начинается еще до завершения второго этапа (элонгация минус-цепи ДНК справа налево). Синтез минус-цепи правого LTR завершается копированием U3-области РНК (рис. 13.2, Д). РНКаза Н, вероятно, продолжает разрушать РНК в составе новосинтезированного гибрида РНК—ДНК. После этого может начаться синтез плюс-цепи ДНК правого LTR, которая

будет служить матрицей на третьем этапе репликации — синтезе минус-цепи ДНК (рис. 13.2, 6) [61, 100, 119]. В синтезе плюс-цепи ДНК в качестве матрицы используется минус-цепь ДНК LTR. Затравкой для синтеза плюс-цепи ДНК, вероятно, является вирусная РНК, сохранившаяся к этому моменту около левой границы U3 (обозначение «рр» на рис. 13.2). Хотя эта плюс-цепь ДНК и синтезируется на матрице минус-цепи ДНК правого LTR, в результате она оказывается частью левого LTR (см. ниже). Очень важно отметить, что синтез плюс-цепи ДНК продолжается за LTR и включает образование участка, комплементарного первым 18 нуклеотидам тРНК-затравки, которая продолжает оставаться ковалентно связанной с минус-цепью ДНК; этот участок обеспечивает возможность второго «прыжка» в ходе обратной транскрипции [177].

Вместе с тем синтез минус-цепи ДНК продолжается справа налево и завершается копированием сайта связывания затравки, поскольку следующие за ним области U5 и R уже удалены РНКазой Н (рис. 13.2, Ж). На этом завершается второй этап репликации ДНК.

Для начала третьего этапа синтеза минус-цепи ДНК требуется, чтобы ревертаза вновь сменила матрицу, на этот раз на плюс-цепь LTR. Этот второй «прыжок», вероятно, обеспечивается 18 нуклеотидами фрагмента плюс-цепи, комплементарными тРНК. РНКаза Н, по-видимому, удаляет тРНК, спаренную с плюс-ДНК (рис. 13.2, 3), после чего «освободившиеся» 18 нуклеотидов спариваются с комплементарным им участком на конце плюс-ДНК (рис. 13.2, И). Затем синтезируется минус-цепь левого LTR (рис. 13.2, К), которая достраивается до конца и вытесняет минус-цепь правого LTR. Таким образом, плюс-цепь LTR, построенная исходно на правом LTR, оказывается слева. Затем достраивается оставшаяся часть плюс-цепи (рис. 13.2, Л) и в результате возникает тупоконечная линейная двухцепочечная ДНК с повторами LTR на концах.

Фаза III: интеграция вирусной ДНК

По крайней мере одна копия вирусной ДНК оказывается интегрированной с ДНК каждой успешно зараженной клетки, а большинство клеток, продуцирующих вирус, содержит 4—10 копий провирусов [50]. Внедрившись в клеточный геном, провирус в дальнейшем реплицируется и передается дочерним клеткам вместе с остальной ДНК. Первые интегрированные провирусы обнаруживаются через 8 ч после заражения [189], большинство же копий вирусной ДНК интегрирует в течение 3 дней после заражения. Зараженная клетка может вновь заражаться тем же

вирусом, пока не приобретет резистентность к заражению в результате образования вирусного гликопротеина. По крайней мере некоторые из провирусов не в состоянии обеспечить продукции вируса, поскольку они не транскрибируются или оказываются повреждены мутациями. Первое вирусное потомство появляется еще до того, как клетка становится устойчивой к суперинфекции (обычно через 1—2 дня после заражения). Поэтому многие зараженные клетки могут вновь инфицироваться вирусами, появившимися в результате первого цикла репликации [50].

Свободные линейные провирусные ДНК представляют собой предшественники интегрированных провирусов. Следует отметить, однако, что процесс интеграции еще мало исследован. Известно, что для его успешного осуществления необходимы концы LTR, поскольку мутанты, утратившие эти последовательности, не способны к интеграции [131]. Интеграция требует также неизвестных клеточных факторов [191]. Кроме того, видимо, необходима эндонуклеазная активность ревертазы, поскольку мутанты MuLV с deletированным С-концевым участком ревертазы не способны встраивать свою ДНК в клеточный геном (S. Goff, личное сообщение). Установлено, что эндонуклеаза ретровирусов птиц *pr32^{pol}* преимущественно связывается с определенными участками LTR ASLV [118].

Хотя механизм интеграции вирусной ДНК остается неизученным, анализ последовательностей клонированных провирусов, а также сайта их интеграции с хозяйской ДНК позволил установить как структуру провирусной ДНК, так и те изменения, которые происходят в клеточных последовательностях, прилегающих к месту интеграции, в ходе инфекции. Вирусная ДНК интегрирует с сохранением ориентации, характерной для свободной линейной провирусной ДНК: LTR-*gag-pol-env*-LTR [88, 152]. Однако в клеточном геноме существует много мест, в которые может встроиться провирус [163]. Последовательности, в которые он встраивается, обычно не содержат гомологий с вирусной ДНК. Более того, у провирусов нет тенденции включаться в уже существующие в геноме последовательности эндогенных или экзогенных ретровирусов. Эти данные свидетельствуют о том, что провирус может внедриться в любое место хозяйской ДНК.

Есть много сходного между интеграцией ДНК ретровирусов и подвижных генетических элементов низших организмов [82, 87, 161, 163, 187]. При интеграции провирус теряет по 2 концевых нуклеотида с каждого конца, а участок хозяйской ДНК (длиной от 4 до 6 bp в зависимости от вида вируса), в который встраивается провирус, дублируется. В результате и справа, и слева от включенного провируса находится клеточная нуклео-

тидная последовательность, которая до интеграции была представлена лишь одной копией.

Часть линейных свободных молекул вирусной ДНК в ядрах превращается в ковалентно замкнутые кольца, но неизвестно, являются ли они предшественниками интегрированных провирусов [159]. Количество кольцевых провирусов нарастает в первые 2—3 дня после заражения и может достигать 100 копий на клетку. Каждый такой провирус содержит две или одну копию LTR (рис. 13.2). Еще через несколько дней эти неинтегрированные ДНК исчезают. Хотя кольцевые провирусы инфекционны и удобны для клонирования [70], их удельная инфекционность значительно ниже, чем у линейных форм. В опытах по трансфекции кольцевые ДНК в отличие от линейных не интегрировали в правильной (относительно своих LTR) ориентации [20].

Фаза IV: экспрессия вирусной ДНК

В хронически инфицированных клетках вирусная РНК считается с интегрированных провирусов. Свободная ДНК может экспрессироваться, но для сохранения провируса необходима его интеграция. В клетках, содержащих несколько провирусов, обычно бывает трудно разобраться, какой из них транскрибируется. Разные клетки одной популяции могут существенно (в десятки и сотни раз) различаться по уровню экспрессии вируса [50, 189].

Провирус является транскрипционной единицей с собственными регуляторными последовательностями. Однако экспрессия конкретного провируса зависит как от вирус-специфических, так и от хозяйских факторов, в частности от места интеграции, физиологического состояния клетки и LTR. В отличие от многих других вирусов у ретровирусов продукты экспрессии генома не участвуют в контроле их экспрессии, а экспрессия провируса зависит только от хозяйских ферментов. Как и большинство клеточных генов, транскрипционно активные провирусы локализованы в гипометилированных местах генома, чувствительных к ДНКазе I [15]. При метилировании *in vitro* клонированные провирусы могут утрачивать инфекционность [115, 167]. Провирусы, локализованные в гиперметилированных областях генома, устойчивых к ДНКазе I, обычно не экспрессируются. Таким образом, нормальные во всех отношениях провирусы могут быть «молчащими», вероятно, потому, что находятся под влиянием фланкирующих последовательностей клетки-хозяина.

Вирус-специфическая регуляция экспрессии осуществляется с помощью LTR [11, 17, 182], несущих промоторы, энхансер транскрипции, сигналы полиаденилирования [55, 62, 111, 205]. Транскрипция начинается на левом конце последовательности R ле-

вого LTR. Как и большинство эукариотических генов, провирусы транскрибируются с помощью клеточной РНК-полимеразы II. Вирусные транскрипты полиаденилируются за правым концом последовательности R правого LTR; сигнал полиаденилирования (обычно AATAAA) расположен внутри R примерно за 20 нуклеотидов перед ее правым концом. Итак, транскрипция начинается за левым, а заканчивается добавлением poly(A)-участка, перед правым концом провируса. Область U3 всех LTR содержит также ССААТ- и ТАТАА-участки или сходные последовательности, входящие в состав промоторов РНК-полимеразы II и расположенные непосредственно перед началом транскрипции. Пока неясно, насколько вариации в последовательности промоторного участка LTR влияют на эффективность экспрессии вируса.

В состав LTR входят также элементы, усиливающие транскрипцию (энхансеры) и работающие независимо от своего положения и ориентации [93]. Относительная «сила» энхансера варьирует в зависимости от вида животного или стадии дифференцировки клеток [49, 106]. Свойством энхансера обладает повторяющаяся последовательность с варьирующей длиной (от 72 до 101 bp), которая находится в области U3 перед промотором. Как отмечается в разделе «Патогенность v-оис-вирусов», энхансер может заметно влиять на характер патогенности вируса.

Другой тип регуляции характерен для LTR MMTV. Уже давно было замечено, что обработка клеток, зараженных MMTV, глюкокортикоидами ведет к резкому усилению вирусной экспрессии. Сейчас известно, что такой ответ зависит от особого участка, расположенного в области U3 LTR MMTV и связывающего рецептор глюкокортикоидов [112, 134, 153].

Как отмечалось выше, первичным продуктом транскрипции провируса является полноразмерная молекула РНК. Вирусная РНК обычно составляет от 0,1 до 1% тотальной клеточной РНК, и может достигать 20% полиаденилированной РНК зараженных клеток. У полноценных вирусов эта РНК, как и ее процессированные варианты, выполняет две главные функции: формирует вирионную РНК и служит мРНК для синтеза продуктов генов *gag*, *pol* и *env*. Около половины полноразмерной РНК упаковывается в вирионы, остальная служит мРНК. В клетках обычно содержится несколько больше мРНК для *gag*, чем для *env*, причем продукта гена *gag* синтезируется примерно в 20 раз больше, чем продукта гена *pol* [45, 170]. Каждый из вирусных генов детерминирует синтез полипротеина-предшественника, который затем разрезается по крайней мере на два зрелых полипептида. Процессинг предшественников тесно связан со сборкой вирионов и обсуждается в следующем разделе. Структура мРНК вирусных генов описана ниже.

мРНК для продуктов гена *env* — результат сплайсинга пол-

норазмерной РНК, из которой удалена большая часть последовательностей генов *gag* и *pol* (рис. 13.1). Одна из интересных особенностей этой мРНК состоит в том, что ее акцепторный сайт сплайсинга, а также часть *env*-кодирующих последовательностей расположены перед терминирующим кодоном гена *pol*; открытые рамки генов *env* и *pol* находятся в разных фазах [79, 155, 158, 165, 186]. Донорный сайт сплайсинга у MuLV находится перед геном *gag*, в то время как у RSV — непосредственно вслед за иницирующим кодоном гена *gag*. Поэтому у RSV трансляция начинается с кодона AUG гена *gag*, а у MuLV — с кодона AUG, входящего в состав перекрывающихся участков *pol* и *env* [155].

До сих пор не выявлено различий между вирионной РНК и РНК, которая служит матрицей для синтеза продуктов *gag* и *pol*. Тем не менее времена их полужизни различаются, что указывает на различие их путей метаболизма внутри клетки [105]. Продукт гена *pol* синтезируется в виде длинного слитного полипротеина *gag-pol*. С большинства же молекул полноразмерной мРНК транслируется лишь продукт гена *gag*. Пока неизвестно, чем определяется это различие в трансляции двух генов, ясно лишь, что RSV и MuLV решают эту проблему по-разному. У RSV открытые рамки для *gag* и *pol* находятся в разных фазах, что указывает на возможное участие сплайсинга в образовании матрицы для смешанного продукта *gag-pol* [155]. У MuLV рамки генов *gag* и *pol* находятся в одной фазе и разделены одним стоп-кодоном (амбер-кодоном UAG) [79, 165, 186]. Поэтому слитный продукт *gag-pol* может транслироваться либо со сплайсированной мРНК, либо непосредственно с интактной полноразмерной в случае супрессии амбер-кодона.

Гены *v-onc* экспрессируются сходно с «обычными» вирусными генами, поскольку находятся под тем же вирусным и клеточным контролем. Как уже отмечалось, большинство генов *v-onc* являются слитными с генами *gag* и кодируют гибридные продукты *gag-onc*, у которых N-концевая часть кодируется геном *gag*, а С-концевая — онкогеном. Последовательности онкогенов в этих слитных генах могут замещать большую или меньшую часть гена *gag*, детерминирующую С-конец, и соответственно их экспрессия контролируется аналогично этому гену. Естественно предположить, что место стыка последовательностей *gag* и *onc* находится перед терминирующим кодоном *gag* потому, что ген *pol* транслируется менее эффективно, чем *gag*.

Фаза V: синтез вирусных белков и сборка вирионов

После завершения синтеза и процессинга РНК необходим синтез вирионных белков, которые собираются в частицы, содер-

жащие вирионную РНК [43, 45, 128, 170]. Оболочка вириона образуется на плазматической мембране клетки, поскольку вирус освобождается из клетки почкованием. Сердцевины вирусов С-типа формируются в непосредственной близости от мембраны, тогда как у ретровирусов В- и D-типов капсиды, по-видимому, образуются в цитоплазме. О синтезе, процессинге и модификации вирусных белков накоплена обширная информация. Гораздо меньше изучена сборка вирионов. Как будет ясно из дальнейшего изложения, точная локализация белков в составе вириона неизвестна.

Синтез белков и сборка вирионов идут сходным образом у разных видов ретровирусов, несмотря на то что молекулярные массы белков, выполняющих одни и те же функции, могут существенно различаться. Здесь в качестве примера мы рассмотрим MuLV. У вирусов этой группы нарезание полипротеинов-предшественников происходит в основном уже после сборки вирионов, поскольку свежесобранный вирус несет много неразрезанных предшественников [13]. Это наблюдение позволяет предположить, что последовательность белков в полипротеине имеет значение для их относительного расположения в составе вириона.

Из продуктов гена *gag* образуются все белки сердцевины вириона, за исключением ревертазы. Их одних достаточно, чтобы сформировать вирион, правда, неинфекционный. В случае MuLV белок-предшественник, кодируемый геном *gag*, имеет мол. массу 65 кДа ($\text{Pr}65^{\text{gag}}$). Он нарезается на 4 белка, расположенные в такой последовательности: $\text{NH}_2\text{—p15—pp12—p30—p10—COOH}$. Неясно, какой фермент осуществляет это нарезание — клеточная или вирусная протеаза. Белки *gag* MuLV существуют в гликозилированной и негликозилированной формах. Гликозилированные белки нарезаются из $\text{gPr}80^{\text{gag}}$, который начинает транслироваться с AUG-кодона, расположенного перед другим AUG-кодом для негликозилированного $\text{Pr}65^{\text{gag}}$. У вирусов ASLV гликозилированные продукты *gag* неизвестны. Делеционные мутанты MuLV, неспособные синтезировать $\text{gPr}80^{\text{gag}}$, тем не менее инфекционны [51, 157], что ставит под вопрос биологическую значимость гликозилированных форм.

Очень гидрофобный белок p15^{gag} находится в вирионе предположительно между сердцевинной и оболочкой. В связанной с остатком миристиловой кислоты форме он в заметных количествах выделяется вместе с оболочкой вируса [170, 78]. Гидрофобность p15^{gag} , возможно, позволяет $\text{Pr}65^{\text{gag}}$ связываться с мембраной в ходе морфогенеза вируса [13]. Точная локализация в вирионе кислого белка pp12 , фосфорилированного по остаткам серина, неизвестна. Он может связываться с вирионной РНК, однако отсутствует в вирусных капсидах, выделенных после

растворения наружной оболочки вируса *in vitro*. Предполагают, что большая часть рр12 находится на внутренней поверхности оболочки, т. е. между капсидом и наружной поверхностью оболочки [13]. Главный белок капсида р30 может самопроизвольно формировать частицы в условиях *in vitro*, что соответствует его роли главного компонента сердцевины. Это высокоосновный РНК-связывающий белок, образующий рибонуклеопротеиновый комплекс с вирионной РНК.

Различные свойства продуктов гена *pol* описаны в разделе, посвященном синтезу вирусной ДНК (фаза II) [60]. Как уже отмечалось, продукты гена *pol* синтезируются в виде белка-предшественника Рг 180^{*gag-pol*}. Этот полипротеин и участвует в сборке вирионов. Возможно, его *gag*-кодируемая часть помогает полимеразному фрагменту включаться в вирусную частицу и (или) предохраняет клетку от ревертазной активности, так как Рг 180^{*gag-pol*} не обладает ферментативной активностью.

Продукт гена *env* Рг90^{*env*} гликозилируется и разрезается на два белка — рр70 и р15Е, — которые остаются связанными друг с другом дисульфидными мостиками. Вероятно, р15Е — это трансмембранный белок, С-концевая часть которого находится внутри, а N-концевая — снаружи оболочки вириона [79, 138]. Заметные на электронных фотографиях шипы, по-видимому, представляют собой молекулы р15Е, а булавки на их вершине — это рр70. Гликозилированный белок рр70 детерминирует спектр хозяев и свойства вируса, определяемые по интерференции и нейтрализации.

Каким образом в состав вириона попадают две молекулы РНК и как формируется димерная структура вирионной РНК, неизвестно. Для селективной упаковки РНК в вирион необходима последовательность, расположенная между донорным сайтом сплайсинга и иницирующим кодоном гена *gag* [109, 113, 195]. Мутантные вирусы, в которых она deletирована, успешно заражают клетки и синтезируют вирусные белки, способные «спасать» дефектные по репликации ретровирусы. Однако собственная РНК такого мутанта не способна к упаковке. Соединение тРНК-затравки с вирионной РНК, возможно, отчасти обеспечивается ревертазой, которая избирательно связывает нужную тРНК [130]. Димерная структура РНК-генома образуется в результате нековалентного соединения областей вирусной РНК, отстоящих примерно на 0,4 kb от их 5'-концов [26]. Не исключено, что в этом связывании участвует р10, поскольку попытки реконструировать образование этого комплекса из очищенных субъединиц РНК были неудачными.

Эндогенные вирусы

Эндогенные проретровирусы широко распространены в природе [5, 25, 32, 91, 137, 148]. Многие из них дефектны по репликации в основном из-за небольших структурных дефектов, сходных с теми, которые характерны для многих провирусов, возникших в ходе экзогенного заражения полноценными ретровирусами [127]. Однако даже дефектные провирусы часто способны экспрессировать отдельные вирусные гены.

Так как эндогенные провирусы наследуются как обычные хромосомные локусы и экспрессируются в обычных физиологических условиях, высказывались предположения об их возможной роли в жизнедеятельности организма [137, 184]. Хотя такая возможность полностью и не исключена, есть две группы фактов, свидетельствующих против этой гипотезы. Во-первых, распространение эндогенных провирусов отдельных классов ограничено несколькими видами организмов или даже отдельными представителями одного вида. Например, провирусы интрацистернальных А-частиц присутствуют в геномах некоторых видов грызунов, но не других млекопитающих [98], а эндогенные MMTV есть у одних линий мышей и отсутствуют у других [28]. Во-вторых, путем направленного скрещивания удалось получить кур, свободных от эндогенных ALV [32], которые нормально росли и развивались. Эти факты показывают, что по крайней мере некоторые из эндогенных провирусов не являются абсолютными обязательными для нормальной жизнедеятельности хозяина. Однако всегда остается аргумент, что организм, лишенный одних эндогенных провирусов, может содержать другие.

Не исключено, что эндогенные провирусы — это случайные паразиты генома хозяина. Если они и выполняют какую-нибудь физиологическую функцию, возможно, она связана с защитой организма от заболевания, вызываемого заражением сходным экзогенным вирусом. Хотя куры, не содержащие в геноме эндогенные провирусы, развиваются нормально, они более чувствительны к экзогенным ALV, которые вызывают у них заболевания со значительно более короткими латентными периодами, чем у кур с эндогенными ALV [144].

Эндогенные ретровирусные последовательности в геноме обычно представлены в виде множества локусов эндогенных провирусов каждого класса. Их локализация в геноме обычно определяет место и время их активации [91]. Кластер эндогенных провирусов обнаружен в Y-хромосоме мыши. По-видимому, множественные копии эндогенных провирусов возникли обычным для вируса путем — через обратную транскрипцию и интеграцию с геномом клеток зародышевой линии. После попадания провируса в геном зародышевой клетки он обычно наследуется

как стабильный элемент. У мышей линии AKR, для которых характерны высокие уровни продукции эндогенного экотропного вируса в течение всей жизни, часто наблюдается включение новых локусов эндогенных провирусов в хромосомы клеток зародышевой линии [149]. Возникновение новых эндогенных провирусов удалось смоделировать экспериментально — путем заражения ранних эмбрионов мышей вирусом Mo-MuLV [90]. Такое заражение иногда ведет к появлению животных, несущих один или несколько провирусов Mo-MuLV. Некоторые из них спонтанно активируются в процессе развития животного, часто приводя к появлению Т-клеточных лимфом. Совокупность всех этих сведений позволяет заключить, что эндогенные провирусы возникли в результате экзогенного заражения и включения провирусов в хромосомы клеток зародышевой линии. Впоследствии число копий этих элементов может возрастать в результате повторных актов интеграции активированных провирусных геномов.

Как правило, эндогенные провирусы менее онкогенны для вида-хозяина, чем экзогенные. Они, как уже отмечалось, часто повреждены мутациями, но даже те из них, которые способны к репликации, слабоонкогенны, что обусловлено рядом различий между большинством эндогенных и экзогенных вирусов. Эндогенные вирусы имеют обычно ксенотропный спектр хозяев, что не позволяет им заражать большинство клеток организма, в котором они находятся. Кроме того, U3-области эндогенных и экзогенных вирусов существенно различаются. Могут различаться и другие участки их генома [145]. Вероятно, именно с этими различиями связана меньшая «удельная продуктивность» эндогенных вирусов по сравнению с экзогенными [33]. По-видимому, низкая продуктивность эндогенных вирусов — результат отбора, поскольку от более онкогенных вирусов хозяева погибают. Те природные линии мышей, у которых наблюдаются высокие уровни продукции экотропных эндогенных MuLV (например, *Mus musculus mollosinos*), обладают неизвестным пока механизмом защиты от онкогенного действия этих вирусов. Линии мышей с высокими уровнями экотропных MuLV и высокой частотой вирус-индуцированных лейкозов (например, AKR [68, 148]) поддерживаются лишь в лабораторных условиях.

Рекомбинация ретровирусов

Для ретровирусов характерна высокая частота рекомбинаций при заражении клеток двумя близкородственными вирусами [109, 194]. Доля рекомбинантов после нескольких циклов смешанной инфекции может быть исключительно высокой и достигать 10—50% потомства, причем механизм их возникновения еще предстоит выяснить. Считают, что рекомбинация идет путем

гомологичного кроссинговера, хотя это прямо не показано. Весьма вероятно, что рекомбинации предшествует образование гетерозиготных вирионов, несущих две разные молекулы РНК. Предполагают, что любая РНК, способная к образованию гетеродимеров, участвует в рекомбинации в ходе обратной транскрипции. Рекомбинация между экзогенными и эндогенными вирусами — важный этап в патогенезе MuLV-индуцированных неоплазий у мышей. Полагают, что после заражения клеток с активными эндогенными провирусами экотропными MuLV возникают гетеродимеры, а затем и рекомбинанты.

Мутагенез, индуцированный вирусом

Способность ретровирусов к включению своей ДНК в различные сайты генома хозяина предполагает, что они могут быть причиной инсерционного мутагенеза. Соответствующие мутации — ведущие или не ведущие к злокачественной трансформации клеток — обнаружены как в экспериментальных, так и в природных условиях. Индуцированный ретровирусами мутагенез может быть использован для идентификации и исследования функции клеточных генов.

Наиболее яркий пример инсерционного мутагенеза — активация онкогена *c-myc* в В-лимфомах кур, индуцированных ALV. В этом случае интеграция провируса ведет к усилению транскрипции гена *c-myc*. Активация гена *c-myc* в результате включения провируса интрацистернальных А-частиц в участок, расположенный перед онкогеном, была продемонстрирована дважды [16]. Пример провирусного включения, не связанного с трансформацией, был обнаружен у мышей линии DBA/2J, у которых рецессивная мутация, проявляющаяся в светлой окраске шерсти, оказалась сцеплена с определенным локусом эндогенного MuLV [31]. Этот провирус, вероятно, встроился в ген, определяющий окраску шерсти, и нарушил его работу, возможно, влияя на сплайсинг. Редкие мыши DBA/2J, ревертировавшие к нормальному фенотипу, утрачивают этот локус эндогенного провируса, за исключением одной копии LTR. При этом в результате гомологичной рекомбинации между двумя LTR удаляются оба вирусных сайта сплайсинга и, предположительно, восстанавливается нормальная функция гена. В данном случае индуцированный ретровирусом инсерционный мутагенез помог идентифицировать и клонировать неизвестный ранее клеточный ген.

Один из тех провирусов Mo-MuLV, который был экспериментально введен в геном клеток зародышевой линии мыши, привел к возникновению рецессивной летальной мутации: гомозиготные по этому локусу особи гибли в эмбриогенезе [154]. Как было установлено, провирус внедрился в ген $\alpha-1(I)$ коллагена;

Отсюда следует, что для нормального развития необходима экспрессия этого гена.

Ретровирусный мутагенез показан и *in vitro*: вирус Mo-MuLV использовали как инсерционный мутаген, вызывающий реверсию фенотипа крысиных клеток, трансформированных RSV [190]. У многих ревертантов геном Mo-MuLV оказался интегрированным с провирусом RSV.

Патогенность v-onc⁻-вирусов

Способные к репликации ретровирусы, не имеющие онкогенов (v-onc⁻), обычно вызывают развитие болезни после длительного латентного периода [179]. Как правило, при этом индуцируются одна или несколько форм неопластических заболеваний, хотя иногда возможна и другая патология — например, истощение или неврологические нарушения. Наиболее детально изучены опухолевые процессы, индуцируемые ALV у кур. Неоплазии возникают через несколько месяцев после заражения, несмотря на постоянно высокое образование вируса в организме. Это свидетельствует о том, что трансформация — редкое событие. Моноклональность возникающих опухолей также говорит в пользу этого предположения. Можно предложить два объяснения наблюдаемым результатам: либо клетки-мишени редко заражаются вирусом, либо трансформация — многоступенчатый процесс. Недавние исследования указывают на справедливость второго объяснения.

Определенные штаммы онкогенных ALV вызывают преимущественно В-клеточные лимфомы. В подавляющем большинстве случаев в геноме лейкозных клеток обнаруживается провирус ALV, интегрированный вблизи гена *c-myc* [77]. Вероятно, эта сайт-специфическая интеграция — случайное событие, редко происходящее при заражении клеток-мишеней. Однако клетки с провирусами в этом сайте получают селективные преимущества. Провирус в таких опухолях часто содержит протяженные делеции, однако последовательности LTR ALV в нем сохраняются [133]. Интеграция провируса обычно ведет примерно к 50-кратному повышению уровня экспрессии *c-myc* за счет влияния вирусного LTR. В большинстве случаев транскрипция онкогена иницируется в обычном месте внутри LTR — это явление называют инсерцией промотора. Оно наблюдается также в В-лимфомах кур, индуцированных REV [124]. В редких случаях провирус, включенный перед *c-myc*, находился в обратной, относительно направления транскрипции онкогена ориентации, а в одной опухоли провирус включался за *c-myc*. Повышенная транскрипция онкогена в этих случаях была связана с действием вирусного энхансера. Ряд штаммов ALV вызывает эритробластоз: при

этом наблюдается интеграция провируса вблизи онкогена *c-erb B* [57].

Другим важным шагом на пути к пониманию особенностей патогенеза ALV-индуцированных лейкозов стали эксперименты по трансфекции ДНК из лейкозных клеток в клетки NIH 3T3. Такая трансфекция регулярно приводила к образованию фокусов трансформации, однако вызывающий эту трансформацию ген *Blym* не сцеплен с *c-myc* и не несет вирусных последовательностей [65]¹. (В отличие от большинства других онкогенов *Blym* до сих пор не найден в составе генома ретровируса). Эти данные показывают, что для злокачественной трансформации необходима реализация по крайней мере двух событий, лишь одно из которых прямо связано с ALV.

Обнаруженная связь между местом интеграции провируса и активацией онкогенов в ходе возникновения опухолей определила поиск сходных явлений для ретровирусного канцерогенеза у млекопитающих. Повышенные уровни экспрессии *c-myc* характерны для ряда линий мышиных плазмацитом, индуцированных пристаном или A-MuLV [123]. Механизм индукции этой экспрессии неизвестен. В отличие от птиц у млекопитающих в опухолях в большинстве случаев не удалось обнаружить транскрипции онкогенов, иницированной вирусными LTR. Однако в опухолях, индуцированных MMTV [126, 135] и MuLV [185, 208], выявлены сходные сайты интеграции провирусов². Эти сайты не сцеплены с известными онкогенами, а их размер значительно превышает сайты интеграции провирусов ALV вблизи *c-myc* в В-лимфомах кур. Биологический смысл этого явления еще предстоит выяснить. В клетках неоплазий коров, индуцированных вирусом бычьего лейкоза, и неоплазий человека, ассоциированных с HTLV, не было найдено сайтов закономерной интеграции провирусов. Возможно, и в этих случаях в трансформации участвует несколько онкогенов. Например, в мышиных лимфомах, индуцированных различными агентами, часто наблюдается трисомия по участку хромосомы 15, несущему онкоген *c-myc* [94], а в вирусных лимфомах мышей показана активация клеточных онкогенов [29].

Помимо влияния вирусной инфекции на активацию клеточных онкогенов, изучаются и другие аспекты ретровирусного патогенеза [179]. Установлено, что в возникновении заболевания

¹ Позже установлено, что сложившиеся представления о *Blym* и *Tlym* ошибочны. Они являются результатом некорректно проведенных экспериментов. — Прим. перев.

² Клеточные гены, расположенные в местах преимущественной интеграции ДНК MMTV называют *int-1*, *2*, *3*... и относят к клеточным онкогенам. — Прим. перев.

важную роль играет ген *env*, U3-область LTR и некоторые другие участки генома [145].

У мышей линии AKR, у которых спонтанная активация эндогенного MuLV ведет к развитию лейкозов, для появления опухоли необходимо предварительное изменение в гене *env* и U3-области LTR MuLV [21, 22, 25, 39, 179]. Оба этих изменения происходят в результате двух независимых актов рекомбинации геномов MuLV — активированного экотропного и неэкотропного провируса. При этом вирус MuLV получает ген *env* вируса MCF [22, 73]. Как отмечалось выше, вирусы с такими генами *env* и экотропные вирусы используют разные рецепторы для проникновения в клетку [141]. Вероятно, ген *env* MCF-типа позволяет рекомбинантному вирусу проникать в клетки-мишени [24]. Возможно также, что продукты гена *env*-MCF могут непосредственно вызывать опухолевую трансформацию, воздействуя на клеточную мембрану или стимулируя деление тех лимфоцитов, которые несут специфические рецепторы продукта гена *env* [117]. В этой связи интересно отметить, что продукт частично делектированного гена *env* вируса Френд, вызывающего образование фокусов в селезенке (SFFV), обладает сходными биологическими свойствами [108]. Хотя этот *v-onc*-вирус с внутренней делецией в гене *env* и не способен трансформировать фибробласты в культуре, он индуцирует образование макроскопических фокусов делящихся клеток в селезенках зараженных мышей уже через неделю после заражения. Генетический анализ позволил связать этот эффект с геном *env* и LTR SFFV, и следовательно с прямым действием укороченного генного продукта.

Результаты, полученные при исследовании рекомбинантов ALV и MuLV, свидетельствуют об участии U3-области LTR в определении онкогенности вируса и его тропности в отношении различных тканей [21, 25, 39]. Вероятно, этот эффект связан с изменениями в промоторной и энхансерной областях LTR. В отличие от эндогенного экотропного MuLV мышей AKR некоторые штаммы экзогенного экотропного вируса вызывают заболевания (опухли) с короткими латентными периодами (менее двух месяцев). Эти MuLV уже имеют LTR, обеспечивающий их способность к заражению клеток-мишеней, и им для приобретения онкогенности требуется только одно рекомбинационное событие — с геном *env* MCF-типа [40].

Эндогенные провирусы и клеточные гены могут существенно влиять на исход вирусной инфекции [107, 179]. Например, для возникновения опухоли требуются большие количества вируса с определенным геном *env*. Заражению клеток-мишеней может препятствовать иммунизация животного против соответствующего продукта гена *env* или вирусная интерференция, связанная, например, с экспрессией родственного эндогенного провиру-

са [144]. Можно также защитить животное от вирусной лимфомы, если предварительно заразить его непатогенным МСФ.

Прежде чем перейти к описанию онкогенсодержащих ретровирусов, отметим одно необычное свойство HTLV, проявляемое *in vitro*, а может быть и *in vivo*. В отличие от других *v-onc*⁺-вирусов, не меняющих ростовые свойства клеток, HTLV при заражении Т-лимфоцитов периферической крови значительно повышает их способность к росту *in vitro* [139]. Заражение HTLV индуцирует появление на поверхности Т-лимфоцитов Тас-антигена — рецептора фактора роста Т-клеток человека (TCGF) [102]. Поскольку при продуктивной инфекции нелимфоидных клеток HTLV появление этого антигена не индуцируется, весьма маловероятно, чтобы он кодировался геном вируса [23]. Тем не менее, вероятно, именно наличие рецепторов TCGF является причиной повышения способности Т-клеток к росту *in vitro*.

Патогенность *v-onc*⁺-вирусов

Трансформирующие (*v-onc*⁺) ретровирусы встречаются сравнительно редко. Они выделены из опухолей многих видов животных, включая птиц, грызунов, кошек и нечеловекообразных приматов [8, 9]. Такие ретровирусы дефектны по репликации и выделяются в комплексе с вирусами-помощниками, трансдуцирующими онкоген. В природных условиях *v-onc*⁺-ретровирусы обычно не передаются от животного к животному, но в лаборатории могут легко передаваться пассированием в виде бесклеточного экстракта в экспериментах на животных или в культуре.

Каждый из онкогенсодержащих ретровирусов вызывает конкретный набор неоплазий с короткими латентными периодами. Онкогены безусловно необходимы для индукции заболевания. Что касается других вирусных генов, то их роль не совсем ясна. Инъекция курам субгеномного фрагмента ДНК RSV, состоящего из LTR и *v-src*, вызывает образование опухолей [56]. При относительно небольших изменениях последовательности онкогенов может изменяться спектр вызываемых ими опухолей [47, 66, 206]. Любопытно, что если RSV вызывает у кур саркомы, то его онкоген *v-src* в составе вектора, полученного на основе амфотропного MuLV, индуцирует у мышей эритробластоз [3]. Предстоит выяснить, связаны ли эти различия в онкогенности с различиями видов животных, с природой LTR или с другими особенностями вируса-переносчика.

За 75 лет, прошедших с момента открытия RSV, выделено более 40 независимых изолятов онкогенсодержащих ретровирусов. Однако количество переносимых ими онкогенов несколько меньше (табл. 13.2), поскольку некоторые трансформирующие вирусы несли одни и те же онкогены даже в тех случаях, когда

Таблица 13.2. Онкогены и онкобелки ретровирусов ¹

Онкоген	Вирус-прототип	Источник вируса	Локализация белка в клетке	Свойство белка
<i>src</i>	Вирус саркомы Рауса	Курица	Плазматическая мембрана	Тирозинкиназа
<i>yes</i>	Вирус саркомы птиц Y73	»		»
<i>abl</i>	Вирус лейкоза мышей Абельсона	Мышь	То же	»
<i>ros</i>	Вирус саркомы птиц UR II	Курица		»
<i>fes (-fps)</i>	Вирус саркомы кошек, шт. Снайдер—Тейлен (Фуджинами)	Кошка (курица)	Цитоплазма	»
<i>fgr</i>	Вирус саркомы кошек (шт. Гарднер—Рашид)	Кошка		»
<i>fms</i>	Вирус саркомы кошек (шт. Мак-Доноу)	»	Цитоплазма	Гликопротеин
<i>erb B</i>	Вирус эритробластоза птиц	Курица	Плазматическая мембрана	»
<i>mos</i>	Вирус саркомы мышей Молони	Мышь	Цитоплазма	
<i>raf</i>	Вирус саркомы мышей 3611	»		
<i>ras^H</i>	Вирус саркомы мышей Харви	Крыса	Плазматическая мембрана	GDP/GTP-связывающий
<i>gas^K</i>	Вирус саркомы мышей Кирстен	»	То же	»
<i>myc</i>	Вирус миелоцитоматоза птиц MC29	Курица	Ядерный матрикс	ДНК-связывающий
<i>myb</i>	Вирус миелобластоза птиц	»	То же	
<i>fos</i>	Вирус остеосаркомы FBJ	Мышь	Ядро	
<i>ski</i>	Вирус птиц SKV770	Курица		
<i>rel</i>	Вирус ретикулоэндотелиоза птиц	Индюк		
<i>sis</i>	Вирус саркомы обезьян	Шерстистая обезьяна	Цитоплазма	Сходен с PDGF
<i>erb A</i>	Вирус эритробластоза птиц	Курица		
<i>ets</i>	Вирус E26 птиц	»		
<i>mil</i>	Вирус MN 2 птиц	»		

¹ Из [101] с некоторыми изменениями.

они были выделены от животных разных видов. Возможно, что более 20 обнаруженных в составе ретровирусов онкогенов, представляют основную часть трансформирующих генов позвоночных.

Прототипы вирусных онкогенов — *c-onc* — представляют собой высококонсервативные клеточные гены, обнаруживаемые у многих эукариот [8, 29, 101]. Протоонкогены и их продукты были исходно обнаружены по гомологии с вирусными онкогенами и онкобелками. Последовательности каждого из генов *c-onc* обнаруживаются в геномах всех позвоночных, а некоторые онкогены найдены и у беспозвоночных, например у дрозофилы [83] и даже у дрожжей [36, 58]. Предполагают, что протоонкогены участвуют в регуляции клеточного деления и дифференцировки. Определенные *c-onc* экспрессируются в разной степени в различных эмбриональных тканях [122].

Как и многие эукариотические гены, большинство протоонкогенов имеют сегментированную интрон-экзонную структуру. Единственное исключение — *c-mos* — ген мыши, который не имеет интронов. У некоторых онкогенов обнаружены безынтронные процессированные псевдогены [172, 174]. Напомним, что у вирусных онкогенов интроны тоже отсутствуют.

Рекомбинационный механизм возникновения ретровирусов, трансдуцирующих онкогены, остается невыясненным. Как правило, не обнаруживается выраженных участков гомологии между последовательностью протоонкогена и, собственно, вирусного генома [172, 174]. Возможно, существенную роль играет интеграция провируса вблизи *c-onc*. Клеточный безынтронный ген *c-mos* можно искусственно превратить в вирусный онкоген, если присоединить его вслед за участком, включающим ретровирусный LTR и 5'-некодирующую вирусную последовательность, этой ДНК трансформировать клетки и затем заразить их полноценным MuLV [12]. 3'-Концевую часть генома возникающего трансформирующего вируса дает вирус-помощник, вероятно, в результате негомологичной рекомбинации [63].

При сравнении клеточных и вирусных онкогенов возникает парадокс: несмотря на сходство аминокислотных последовательностей их продуктов, *c-onc* выполняет важную физиологическую функцию, а *v-onc* — высокоонкогенен. Есть по крайней мере три возможных объяснения этому. Различия могут быть связаны с повышенной экспрессией нормального клеточного гена; мутациями, изменяющими протоонкоген, и влиянием кодируемой вирусом части, например в составе слитных белков gag-onc. Хотя пока и не проведено анализа различных мутантных конструкций онкогенов *in vivo*, результаты, полученные в культуре ткани на некоторых *v-onc* и *c-onc*, позволяют заключить, что все три возможности, по крайней мере иногда, реализуются.

Выше отмечалось, что, попав в геном вируса, онкоген боль-

ше не находится под контролем клеточных регуляторных последовательностей. Теперь его экспрессия определяется теми же факторами, что и экспрессия других вирусных генов. Поэтому в большинстве случаев уровень экспрессии *v-onc*, определяемый LTR, оказывается выше, чем его клеточного аналога.

Возможность повышения онкогенности *c-onc* после его помещения под контроль ретровирусного LTR проверена *in vitro* для мышиногo *c-mos* [12] и крысиного и человеческого *c-ras*^H [18, 35]. Конструкции, в которых онкогены были помещены за LTR, обладали способностью вызывать очаги трансформации на нетрансформированных клетках NIH 3T3, хотя эффективность трансформации *c-ras* в этих условиях была заметно ниже, чем его вирусного аналога. Тем не менее клетки, трансформированные клеточным онкогеном, активированным LTR, при введении мышам образовывали опухоли. Эти результаты показывают, что помещение нормального *c-onc* под контроль LTR может индуцировать его онкогенность. Отметим, что человеческий ген *c-ras* экспрессируется и в норме, однако уровня его экспрессии недостаточно для трансформации клеток [173]. Подобное сравнение невозможно для *c-mos*, поскольку в отсутствие LTR он практически не экспрессируется [122]. Таким образом, по крайней мере для *c-ras*^H повышение уровня экспрессии онкогена ассоциировано с трансформацией клеток. Однако это не обязательно справедливо для других онкогенов: предварительные результаты показывают, что повышение экспрессии нормального куриного *c-src* не ведет к трансформации (J. M. Bishop, личное сообщение). Кроме того, замена вирусного гена *v-ras*^H в составе генома Ha-MuSV на клеточный ген *c-ras*^H ведет к заметному понижению онкогенности вируса (P. E. Tambourin, C. K. Chattopadhyay, D. R. Lowy), неопубликованные данные.

Недавно на примере *v-ras* было показано, что мутации в онкогене могут быть важны для его трансформирующей активности. Продукт *v-ras*^H отличается от своего клеточного аналога всего двумя из 189 аминокислот (в положениях 12 и 59) [101]. Каждая из этих аминокислотных замен существенно повышает трансформирующую активность гена *ras*^H *in vitro*. К тому же мутанты Ha-MuSV, содержащие лишь одну из этих замен, оказались почти столь же онкогенны, как и исходный вирус (P. E. Tambourin, C. K. Chattopadhyay, D. R. Lowy), неопубликованные данные). Онкоген *v-myb* кодирует укороченный по сравнению с клеточным белком продукт, что, вероятно, служит причиной его онкогенности [95].

Возвращаясь к возможности участия *gag*-кодируемых последовательностей в онкогенности слитных белков *gag-onc*, отметим, что мутанты вируса лейкоза мышей Абельсона (из его названия — A-MuLV — создается неверное впечатление, что это компе-

тентный по репликации лейкозный ретровирус), утратившие участки гена *gag*, теряют способность трансформировать *in vitro* лимфоидные клетки, хотя и продолжают трансформировать фибробласты [140]. Если из состава слитного онкогена *gag-fps* вируса саркомы Фуджинами удалить последовательности гена *gag*, то его онкогенность при этом не утрачивается [54].

Существует несколько классов онкогенов, подразделяемых по сходству их последовательностей, внутриклеточной локализации кодируемых ими белков и функциональной активности этих белков. Одну из групп составляют онкогены семейства *ras*, включающего по крайней мере трех представителей — *ras^H*, *ras^K* и *ras^N* [19, 101, 116, 175]. Структура и последовательности этих онкогенов весьма близки. Тем не менее в составе геномов трансформирующих вирусов найдены лишь *ras^H* и *ras^K*. *ras*-Кодируемые белки расположены преимущественно на внутренней поверхности плазматической мембраны [203]. Эти белки объединяет способность к нековалентному связыванию гуаниловых нуклеотидов и отсутствие у них тирозинкиназной активности.

Другой класс (который мы назовем *src*-класс) включает гены, имеющие гомологии с онкогеном *src*. Эта гомология в отличие от онкогенов *ras* ограничена небольшим участком последовательности, кодирующей белок. Кроме *src*, сюда входят онкогены *fes-fps* (*fes* — наименование этого онкогена у млекопитающих, а *fps* — у птиц), *abl*, *yes*, *ros*, *fgr*, *fms*, *erb B* и *mos* [8, 9, 101, 207]. Белки, кодируемые большинством из этих онкогенов, относятся к протеинкиназам, осуществляющим избирательное фосфорилирование остатков тирозина *in vivo* и *in vitro*. Такая активность не обнаружена пока у продукта онкогена *mos*. Внутриклеточная локализация этих белков также несколько различается. Продукт *erb B* — гликопротеин, расположенный на наружной поверхности мембраны [66], продукт *fms* — цитоплазматический гликопротеин, белки *src* и *abl* находятся на внутренней поверхности мембраны [202, 204], а продукты *fps* и *mos* локализованы в цитоплазме [52, 132]. По-видимому, функция этих белков связана с их внутриклеточной локализацией. Например, онкогенность RSV, мутантных по *v-src*, коррелирует с локализацией продукта онкогена на плазматической мембране [97].

Сначала казалось, что открытие тирозинкиназной активности *src*-белка [89] быстро приведет к идентификации клеточных мишеней его ферментативной активности. Однако этот вопрос еще до сих пор не решен. Было найдено много белков, которые фосфорилируются протеинкиназами *src*-группы, однако тщательный анализ не позволил выявить явных корреляций между конкретными фосфобелками и трансформированным фенотипом [30]. Часть мутантов, температурочувствительных по трансформации, являются температурочувствительными и по тирозинкиназной

активности, и все мутанты, дефектные по этой активности, дефектны и по трансформации [9]. Однако у других *src*-мутантов не было выявлено корреляций между трансформирующей и тирозинкиназной активностями [81, 197]. Отметим также, что один из генов *src*-класса — ген *mos* — является высокоонкогенным, хотя его продукт и не обладает тирозинкиназной активностью.

Белки — продукты онкогенов *myc* и *fos* — локализованы в ядре и составляют один, а может быть и два разных класса онкобелков [1, 71, 101]. Гомологии между этими онкогенами не выявлено, и не исключено, что они трансформируют клетки разными способами. Ген *v-sis*, который, как оказалось, кодирует измененную форму фактора роста тромбоцитов (PDGF) [143, 196], возможно, относится еще к одному классу трансформирующих генов.

Клеточные трансформирующие гены

Хотя детальное описание клеточных онкогенов и не является целью настоящей главы, их тесная связь с вирусными онкогенами заставляет кратко остановиться на их свойствах. Анализ клеточных онкогенов помог в понимании функции онкогенов. Клеточные трансформирующие гены идентифицированы во многих опухолях человека и животных. Эти измененные варианты нормальных генов выявляют с помощью двух разных подходов: либо используя способность ДНК из опухолевых клеток трансформировать клетки NIH 3T3 (или другие линии), либо по гомологии необычных генов с вирусными онкогенами или их продуктами.

Как показали биохимические тесты, в различных опухолях человека и животных ген *c-myc* часто изменен [4, 76, 94, 101, 103]. Изменения *c-myc* ассоциированы с повышенной экспрессией этого гена — увеличением количества РНК и белка. В В-клеточных лимфомах человека, изученных наиболее подробно, эта измененная экспрессия обычно связана с перестройкой гена *c-myc*, обусловленной хромосомной транслокацией, в результате которой он переносится к генам, кодирующим иммуноглобулины. Активация *c-myc* при этом, как полагают, связана с действием тканеспецифического энхансера, локализованного в локусе генов иммуноглобулинов. Любопытно, что как и в случае куриных В-лимфом, индуцированных ALV, из человеческих В-лимфом выделен клеточный онкоген *Blym* [42].

Используя клетки NIH 3T3, удалось выделить множество клеточных онкогенов из опухолей разных типов, хотя далеко не из всех проверенных [29, 48, 101]. В большинстве случаев активированными онкогенами оказались различные представители семейства *c-ras*. ДНК из нормальных клеток не способна транс-

формировать клетки NIH 3T3. При активации *c-ras* не происходит перестроек в гене, однако в некоторых случаях отмечена амплификация онкогена. Во всех выполненных к настоящему моменту исследованиях активированные *c-ras* содержали точечные мутации, ведущие к замене аминокислот в положениях 12 и 61.

В отличие от клеток NIH 3T3 первичные эмбриональные клетки грызунов не трансформировались клеточными *c-ras* или активированными *c-myc* и *v-myc*. Однако введение обоих активированных онкогенов — *c-ras* и *c-myc* (или *v-myc*) — приводит к трансформации эмбриональных крысиных клеток [101]. Сходную комплементацию наблюдали между геном *myc* и вирусными онкогенами *src*-класса. Кроме того, роль *c-myc* могут играть E1A-область генома аденовируса [151] или фрагмент ДНК вируса полиомы, кодирующий большой Т-антиген. А ген среднего Т-антигена вируса полиомы может выступать в роли онкогена *ras*. Эти результаты позволяют сделать несколько выводов: онкогены можно разделить по крайней мере на две группы комплементации; два онкогена вместе могут быть активнее каждого из них по отдельности; онкогены могут быть функционально сходны с определенными генами ДНК-содержащих опухолевых вирусов.

Заключение

Ретровирусы оказались удивительным объектом исследования. Сначала их изучали как модель вирусного канцерогенеза, и это направление оказалось успешным во многих отношениях. Изучение ретровирусов позволило глубоко проникнуть в механизм канцерогенеза. Благодаря им был обнаружен набор эволюционно консервативных генов эукариот (*c-onc*), вероятно играющих важную роль в нормальном развитии и дифференцировке. Было установлено, что в разнообразных спонтанно и экспериментально индуцируемых опухолях функционирование этих генов изменяется. Поиск ретровирусов человека привел к открытию по крайней мере одного ретровируса (HTLV), тесно ассоциированного с определенной неоплазией человека. Помимо огромного влияния на развитие онкологии изучение репликации и обратной транскрипции генома ретровирусов, их интеграции с клеточной ДНК и организации регуляторных элементов (LTR) позволило обнаружить новые биологические механизмы функционирования эукариотической клетки. Несомненно, что и в будущем исследования ретровирусов приведут к новым открытиям в экспериментальной патологии, канцерогенезе человека и молекулярной биологии.

Литература

1. Alitalo K., Ramsay G., Bishop J. M., Pfeifer S. O., Colby W. W., Levinson A. D. (1983). Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular *myc* oncogenes, *Nature*, **306**, 274—277.
2. Anderson K. B., Nexø B. A. (1983). Entry of murine retrovirus into mouse fibroblasts, *Virology*, **125**, 85—98.
3. Anderson S. M., Scolnick E. M. (1983). Construction and isolation of a transforming murine retrovirus containing the *src* gene of Rous sarcoma virus, *J. Virol.*, **46**, 594—605.
4. ar-Rushdi A., Nishikura K., Erikson J., Watt R., Rovera G., Croce C. M. (1983). Differential expression of the translocated and the ultraslocated *c-myc* oncogene in Burkitt lymphoma, *Science*, **222**, 390—393.
5. Aslirin S. M., Robinson H. L., Crittenden L. B., Buss E. G., Wyban J., Hayward W. S. (1980). The genetic loci in the chicken that contain structural genes for endogenous avian leucosis viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 1105—1109.
6. Bader J. P. (1965). The requirement for DNA synthesis in growth of Rous sarcoma and Rous-associated viruses, *Virology*, **26**, 253—261.
7. Baltimore D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses, *Nature*, **226**, 1209—1211.
8. Bishop J. M. (1983). Cancer genes comes of age, *Cell*, **32**, 1018—1020.
9. Bishop J. M., Varmus H. E. (1982). Functions and origins of retroviral transforming genes, In: *Molecular Biology of Tumor Viruses; RNA Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmos, and J. M. Coffin, pp. 999—1108, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
10. Buttner J. J. (1942). The milk-influence of breast tumors in mice, *Science*, **95**, 462—463.
11. Blair D. G., McClements W. L., Oskarsson M. D., Fischinger P. J., Vande Woude G. F. (1980). Biological activity of cloned Moloney sarcoma virus DNA: Terminally redundant sequences may enhance transformation efficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3504—3508.
12. Blair D. G., Oskarsson M., Wood T. G., McClements W. L., Fischinger P. J., Vande Woude G. F. (1981). Activation of the transforming potential of a normal cell sequence: A molecular model for oncogenesis, *Science*, **212**, 941—943.
13. Bolognesi D. P., Montelaro R. C., Frank H., Schafer W. (1978). Assembly of type C oncornaviruses: A model, *Science*, **199**, 183—186.
14. Bonner T. I., O'Connell C., Cohen M. (1982). Cloned endogenous retroviral sequences from human DNA, *Science*, **79**, 4709—4713.
15. Breathnach R., Chambon P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 349—384.
16. Canaani E., Drazan O., Klar A., Rechavi G., Ram D., Cohen J. B., Givol D. (1983). Activation of the *c-mos* oncogene in a mouse plasmacytoma by insertion of an endogenous intracisternal A-particle genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7118—7122.
17. Chang E. H., Ellis R. W., Scolnick E. M., Lowy D. R. (1980). Transformation by cloned Harvey murine sarcoma virus DNA: Efficiency increased by long terminal repeat DNA, *Science*, **210**, 1249—1251.
18. Chang E. H., Furth M. E., Scolnick E. M., Lowy D. R. (1982). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homo-

- logous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus, *Nature*, **297**, 479—483.
19. *Chang E. H., Gonda M. A., Ellis R. W., Scolnick E. M., Lowy D. R.* (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4848—4852.
 20. *Chang E. H., Maryak J. M., Wei C.-M., Shih T. Y., Shober R., Cheung H. L., Ellis R. W., Hager G. L., Scolnick E. M., Lowy D. R.* (1980). Functional organization of the Harvey murine sarcoma virus genome, *J. Virol.*, **35**, 76—92.
 21. *Chatis P. A., Holland C. A., Hartley J. W., Rowe W. P., Hopkins N.* (1983). Role of the 3' end of the genome in determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4408—4411.
 22. *Chattopadhyay S. K., Cloyd M. W., Linemeyer D. L., Lander M. R., Rands E., Lowy D. R.* (1982). Cellular origin and role of milk cell focusforming viruses in murine thymic lymphomas, *Nature*, **295**, 25—30.
 23. *Clapham P., Nagy K., Cheingsong-Popov R., Exley M., Weiss R. A.* (1983). Productive infection and cell-free transmission of human T-cell leukemia virus in a nonlymphoid cell line, *Science*, **222**, 1125—1127.
 24. *Cloyd M. W.* (1983). Characterization of target cells for MCF viruses in AKR mice, *Cell*, **32**, 217—225.
 25. *Coffin J. M.* (1982). Endogenous proviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus, and J. M. Coffin, pp. 1109—1204, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 26. *Coffin J. M.* (1982). Structure of the retroviral genomes. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus, and J. M. Coffin, pp. 261—368, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 27. *Coffin J. M., Varmus H. E., Bishop J. M., Essex M., Hardy W. D., Martin G. S., Rosenberg N. E., Scolnick E. M., Weinberg R. A., Vogt P. K.* (1981). A proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes, *J. Virol.*, **49**, 953—957.
 28. *Cohen J. C., Varmus H. E.* (1979). Endogenous mammary tumour virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding, *Nature*, **278**, 418—423.
 29. *Cooper G. M.* (1982). Cellular transforming genes, *Science*, **218**, 801—806.
 30. *Cooper J., Nakamura K. D., Hunter T., Weber M. J.* (1983). Phosphotyrosine-containing proteins and expression of transformation parameters in cells infected with partial transformation mutants of Rous sarcoma virus, *J. Virol.*, **46**, 15—28.
 31. *Copeland N. G., Hutchison K. W., Jenkins N. A.* (1983). Excision of the DBA ecotropic provirus in dilute coatcolor revertants of mice occurs by homologous recombination involving the viral LTRs, *Cell*, **33**, 379—387.
 32. *Crittenden L. B.* (1981). Exogenous and endogenous leukosis virus genes, *Avian. Pathol.*, **10**, 101—112.
 33. *Cullen B. R., Skalka A. M., Ju G.* (1983). Endogenous avian retroviruses contain deficient promoter and leader sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2946—2950.
 34. *Dales S., Hanafusa H.* (1972). Penetration and intracellular release of the genomes of avian RNA tumor viruses, *Virology*, **50**, 440—458.
 35. *DeFeo D., Gonda M. A., Young H. A., Chang E. H., Lowy D. R., Scolnick E. M., Ellis R. W.* (1981). Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3328—3332.
 36. *DeFeo-Jones D., Scolnick E. M., Koller R., Dhar R.* (1983). *ras*-Related gene

- sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature*, **306**, 707—709.
37. DeLarco J., Todaro G. J. (1976). Membrane receptors for murine leukemia viruses: Characterization using purified viral envelope glycoprotein, gp71, *Cell*, **8**, 365—371.
 38. DesGroseillers L., Jolicoeur P. (1983). Physical mapping of the Fv-I tropism host range determinant of BALB/c murine leukemia viruses, *J. Virol.*, **48**, 685—696.
 39. DesGroseillers L., Rassart E., Jolicoeur P. (1983). Thymotropism of murine leukemia virus is conferred by its long terminal repeat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4203—4207.
 40. DesGroseillers L., Villemur R., Jolicoeur P. (1983). The high leukemogenic potential of gross passage A murine leukemia virus maps in the region of the genome corresponding to the long terminal repeat and to the 3' end of env, *J. Virol.*, **47**, 24—32.
 41. Devare S. G., Hanson R. E. Jr., Stephenson J. R. (1978). Primate retroviruses: Envelope glycoproteins of endogenous type C and type D viruses possess common interspecies antigenic determinants, *J. Virol.*, **26**, 316—324.
 42. Diamond A., Cooper G. M., Ritz J., Lane M.-A. (1983). Identification and molecular cloning of the human Blym transforming gene activated in Burkitt's lymphomas, *Nature*, **305**, 112—116.
 43. Dickson C., Peters G. (1982). Protein biosynthesis and assembly. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus, and J. M. Coffin, pp. 513—648, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 44. Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maxam A. M., Maniatis T. (1976). Enzymatic in vitro synthesis of globin genes, *Cell*, **7**, 279—288.
 45. Eisenman R. N., Vogt V. M. (1978). The biosynthesis of oncovirus proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 187—239.
 46. Ellermann V., Bang O. (1908). Experimentelle leukämie bei Hühnern *Zentralbl. Bakteriol.*, **46**, 595—609.
 47. Enrietto P. J., Payne L. N., Hayman M. J. (1983). A recovered avian myelocytomatosis virus that induced lymphomas in chickens: Pathogenic properties and their molecular basis, *Cell*, **35**, 369—379.
 48. Eva A., Tronick S. R., Gol R. A., Pierce J. H., Aaronson S. A. (1983). Transforming genes of human hematopoietic tumors: Frequent detection of ras-related oncogenes whose activation appears to be independent of tumor phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4926—4930.
 49. Even J., Anderson S. J., Hampe A., Galibert F., Lowy D., Khoury G., Sherr C. J. (1983). Mutant feline sarcoma proviruses containing the viral oncogene (v-fes) and either feline or murine control elements, *J. Virol.*, **45**, 1004—1016.
 50. Fan H., Jaenisch R., Maclsaac P. (1978). Low-multiplicity infection of Moloney murine leukemia virus in mouse cells: Effect on number of viral DNA copies and virus production in producer cells, *J. Virol.*, **28**, 802—809.
 51. Fan H., Chute H., Chao E., Feuerman M. (1983). Construction and characterization of Moloney Murine leukemia virus mutants unable to synthesize glycosylated gag polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5965—5969.
 52. Feldman R. A., Wang E., Hanafusa H. (1983). Cytoplasmic localization of the transforming protein of Fujinami sarcoma virus: Salt-sensitive association with subcellular components, *J. Virol.*, **45**, 782—791.
 53. Fine D., Schochetman G. (1978). Type D primate retroviruses: A review, *Cancer Res.*, **38**, 3123—3139.
 54. Foster D. A., Hanafusa H. (1983). An *fps* gene without *gag* gene sequences transforms cells in culture and induced tumors in chickens, *J. Virol.*, **48**, 744—751.
 55. Fuhrman S. A., Van Beveren C., Verma I. M. (1981). Identification of an

- RNA polymerase II initiation site in the long terminal repeat of Moloney murine leukemia viral DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5411—5416.
56. *Fung Y. T., Crittenden L. B., Fadly A. M., Kung H.-J.* (1983). Tumor induction by direct injection of cloned v-src DNA into chickens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 353—357.
 57. *Fung Y. T., Lewis W., Crittenden L. B., Kung H.-L.* (1983). Activation of the cellular oncogene e-erbB by LTR insertion: Molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus, *Cell*, **33**, 357—368.
 58. *Gallwitz D., Donath C., Sanders C.* (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product, *Nature*, **306**, 704—707.
 59. *Gardner M. B.* (1980). Historical background. In: *Molecular Biology of RNA tumor Viruses*, ed. by J. R. Stephenson, pp. 2-46, Academic Press, New York.
 60. *Gerard G. F., Grandgenett D. P.* (1980). Retrovirus reverse transcriptase. In: *Molecular Biology of RNA Tumor Viruses*, ed. by J. R. Stephenson, pp. 346—394, Academic Press, New York.
 61. *Gilboa E., Mitra S. W., Goff S., Baltimore D.* (1979). A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects, *Cell*, **18**, 93—100.
 62. *Gilmartin G. M., Parsons J. T.* (1983). Identification of transcriptional elements within the long terminal repeat of Rous sarcoma virus, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1834—1845.
 63. *Goldfarb M. P., Weinberg R. A.* (1981). Generation of novel, biologically active Harvey sarcoma virus via apparent illegitimate recombination, *J. Virol.*, **38**, 136—150.
 64. *Gopinathan K. P., Weymouth L. A., Kunkel T. A., Loeb L. A.* (1979). Mutagenesis in vitro by DNA polymerase from an RNA tumor virus, *Nature*, **278**, 857—859.
 65. *Goubin G., Goldman D. S., Luce J., Neiman P. E., Cooper G. M.* (1983). Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA, *Nature*, **302**, 114—119.
 66. *Graf T., Beug H.* (1983). Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation, *Cell*, **34**, 7—9.
 67. *Gross L.* (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with Ak-leukemic extracts, or Ak-embryos, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**, 27—32.
 68. *Gross L.* (1970). *Oncogenic Viruses*, Pergamon, Elmsford, NY.
 69. *Haase A. T., Brahic M., Carroll D., Scott J., Stowring L., Traynor B., Ventura P.* (1978). Visna: An animal model for studies of virus persistence. In: *Persistent Viruses*, ed. by J. G. Stevens et al., pp. 643—654, Academic Press, New York.
 70. *Hager G. L., Chang E. H., Chan H. W., Garon C. F., Israel M. A., Martin M. A., Scolnick E. M., Lowy D. R.* (1979). Molecular cloning of the Harvey sarcoma virus closed circular DNA intermediates: Initial structural and biological characterization, *J. Virol.*, **31**, 795—809.
 71. *Hann S. R., Abrams H. D., Rohrschneider L. R., Eisenman R.* (1983). Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines, *Cell*, **34**, 789—798.
 72. *Hartley J. W., Rowe W. P., Huebner R. J.* (1970). Host-range restrictions of murine leukemia viruses in mouse embryo cell cultures, *J. Virol.*, **5**, 221—225.
 73. *Hartley J. W., Wolford N. K., Old L. J., Rowe W. P.* (1977). A new class of murine leukemia virus associated with development of spontaneous lymphomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 789—792.
 74. *Haseltine W. A., Maxam A. M., Gilbert W.* (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: The 5' sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 989—993.

75. Haseltine W. A., Kleid D. G., Panet A., Rothenberg E., Baltimore D. (1976). Ordered transcription of RNA tumor virus genomes, *J. Mol. Biol.*, **106**, 109—131.
76. Hayday A. C., Gillies S. D., Saito H., Wood C., Wiman K., Hayward W. S., Tonegawa S. (1984). Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus, *Nature*, **307**, 334—340.
77. Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia, *Nature*, **290**, 475—480.
78. Henderson L. E., Krutzsch H. C., Oroszlan S. (1983). Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: An unusual post-translational protein modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 339—343.
79. Herr W. (1984). Nucleotide sequence of AKV murine leukemia virus, *J. Virol.*, **49**, 471—478.
80. Hill M., Hillova J. (1972). Virus recovery in chicken cells tested with Rous sarcoma cell DNA. *Nature*, **237**, 35—39.
81. Hirano A., Neil J. C., Vogt P. K. (1983). *ts* transformation mutants of avian sarcoma virus PRCII: Lack of strict correlation between transforming ability and properties of the P105-associated kinase, *Virology*, **125**, 219—229.
82. Hishinuma F., DeBona P. J., Astrin S., Skalka A. M. (1981). Nucleotidesequence of the acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus *ev-1*: Integration creates a 6 bp repeat of host DNA, *Cell*, **23**, 155—164.
83. Hoffmann F. M., Fresco L. D., Hoffmann-Falk H., Shilo B.-Z. (1983). Nucleotide sequences of the *Drosophila src* and *alb* homologs: Conservation and variability in the *src* family oncogenes, *Cell*, **35**, 393—401.
84. Hooks J. J., Gibbs C. J., Jr. (1975). The foamy viruses, *Bacteriol. Rev.*, **39**, 169—185.
85. Hsu T. W., Sabran J. L., Mark G. E., Guntaka R. V., Taylor J. M. (1978). Analysis of unintegrated avian RNA tumor virus double-stranded DNA intermediates, *J. Virol.*, **28**, 810—818.
86. Huebner R. J., Todaro G. J. (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 1087—1094.
87. Hughes S. H., Mutschler A., Bishop J. M., Varmus H. E. (1981). A Rous sarcoma virus provirus is flanked by short direct repeats of a cellular DNA sequence present in only one copy prior to integration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4299—4303.
88. Hughes S. H., Shank P. R., Spector D. H., King H.-J., Bishop J. M., Varmus H. E., Vogt P. K., Breitman M. L. (1978). Proviruses of avian sarcoma virus are terminally redundant coextensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites, *Cell*, **15**, 1379—1410.
89. Hunter T., Sefton B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1311—1315.
90. Jaenisch R. (1980). Germ line integration and mendelian transmission of exogenous type C viruses. In: *Molecular Biology of RNA Tumor Viruses*, ed. by J. R. Stephenson, pp. 131—162, Academic Press, New York.
91. Jaenisch R. (1983). Endogenous retroviruses, *Cell*, **32**, 5—6.
92. Kettmann R., Deschamps J., Coez D., Claustriau J. J., Palm R., Burny A. (1983). Chromosome integration domain for bovine leukemia provirus in tumors, *J. Virol.*, **47**, 146—150.
93. Khoury G., Gruss P. (1983). Enhancer elements, *Cell*, **33**, 313—314.
94. Klein G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men, *Cell*, **32**, 311—315.
95. Klemmner K.-H., Ramsay G., Bishop J. M., Moscovici M. G., Moscovici C., McGrath J. P., Levinson A. D. (1983). The product of the retroviral trans-

- forming gene *v-myb* is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene *c-myb*, *Cell*, **33**, 345—355.
96. Kozak C. A. (1983). Genetic mapping of a mouse chromosomal locus required for mink cell focus-forming virus replication, *J. Virol.*, **48**, 300—303.
 97. Krueger J. G., Garber E. A., Goldberg A. R., Hanafusa H. (1982). Changes in amino-terminal sequences of pp60^{src} lead to decreased membrane association and decreased in vivo tumorigenicity, *Cell*, **28**, 889—896.
 98. Kuff E. L., Smith L. A., Lueders K. K. (1981). Intracisternal A-particle genes in *Mus musculus*: A conserved family of retrovirus-like elements, *Mol. Cell Biol.*, **1**, 216—227.
 99. Kuff E. L., Feenstra A., Lueders K., Smith L., Hawley R., Hozumi N., Schulman M. (1983). Intracisternal A-particle genes as movable elements in the mouse genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1992—1996.
 100. Kung H.-J., Fung Y. K., Majors J. E., Bishop J. M., Varmus H. E. (1981). Synthesis of plus strands of retroviral DNA in cells infected with avian sarcoma virus and mouse mammary tumor virus, *J. Virol.*, **37**, 127—138.
 101. Land H., Parada L. F., Weinberg R. A. (1983). Cellular oncogenes and multidetected carcinogenesis, *Science*, **222**, 771—778.
 102. Lando Z., Sarin P., Megson M., Greene W. C., Waldman T. A., Gallo R. C., Broder S. (1983). Association of human T-cell leukaemia/lymphoma virus with the Tac antigen marker for the human T-cell growth factor receptor, *Nature*, **305**, 733—735.
 103. Leder P., Battey J., Lenoir G., Mouding C., Murphy W., Potter H., Stewart T., Taub R. (1983). Translocations among antibody genes in human cancer, *Science*, **222**, 765—771.
 104. Lenard J., Miller K. D. (1982). Uncoating of enveloped viruses, *Cell*, **28**, 5—6.
 105. Levin J. G., Rosenak M. J. (1976). Synthesis of murine leukemia virus proteins associated with virions assembled in actinomycin D-treated cells: Evidence for the persistence of viral messenger RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1154—1158.
 106. Levinson B., Khoury G., Vande Woude G., Gruss P. (1982). Activation of SV40 genome by 72-base pair tandem repeats of Moloney sarcoma virus, *Nature*, **295**, 568—572.
 107. Lilly F., Pincus T. (1973). Genetic control of murine viral leukemogenesis, *Adv. Cancer Res.*, **17**, 231—277.
 108. Linemeyer D. L., Menke J. G., Ruscetti S. K., Evans L. H., Scolnick E. M. (1982). Envelope gene sequences which encode the gp52 protein of spleen focus-forming virus are required for the induction of erythroid cell proliferation, *J. Virol.*, **43**, 223—233.
 109. Linial M., Blair D. (1982). Genetic of retroviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus, and J. M. Coffin, pp. 649—784, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 110. Lowy D. R., Rowe W. P., Teich N., Hartley J. W. (1971). Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5' iododeoxyuridine and 5' bromodeoxyuridine, *Science*, **174**, 155—156.
 111. Luciw P. A., Bishop J. M., Varmus H. E., Capeecchi M. R. (1983). Location and function of retroviral and SV40 sequences that enhance biochemical transformation after microinjection of DNA, *Cell*, **334**, 705—716.
 112. Majors J., Varmus H. E. (1983). A small region of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat confers glucocorticoid hormone regulation on a linked heterologous gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5866—5870.
 113. Mann R., Mulligan R. C., Baltimore D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus, *Cell*, **33**, 153—159.
 114. Martin M. A., Bryan T., Rasheed S., Khan A. S. (1981). Identification and

- cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4892—4896.
115. McGeedy M. L., Jhappan C., Ascione R., Vande Woude G. F. (1983). In vitro methylation of specific regions of the cloned Moloney sarcoma virus genome inhibits its transforming activity, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 305—314.
 116. McGrath J. P., Capon D. J., Smith D. H., Chen E. Y., Seeburg P. H., Goeddel D. V., Levinson A. D. (1983). Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene, *Nature*, **304**, 501—506.
 117. McGrath M. S., Weissman I. L. (1979). AKR leukomogenesis: Identification and biological significance of thymic lymphoma receptors for AKR retroviruses, *Cell*, **17**, 65—75.
 118. Misra T. P., Grandgenett D. P., Parsons J. T. (1982). Avian retrovirus pp32 DNA-binding protein. Recognition of specific sequences on retrovirus DNA terminal repeats, *J. Virol.*, **44**, 330—343.
 119. Mitra S. W., Goff S., Gilboa E., Baltimore D. (1982). Synthesis of a 600-nucleotide-long plus-strand DNA by virions of Moloney murine leukemia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4355—4359.
 120. Miyamoto K., Gilden R. V. (1971). Electron microscopic studies of tumor viruses, *J. Virol.*, **7**, 395—406.
 121. Moelling K., Bolognsi D. P., Bauer H., Busen W., Plassman H. W., Hausen P. (1971). Association of viral reverse transcriptase with an enzyme degrading the RNA moiety of RNA-DNA hybrids, *Nature, New Biol.*, **234**, 240—243.
 122. Muller R., Slamon D. J., Adamson E. D., Tremblay J. M., Muller D., Cline M. J., Verma I. M. (1983). Transcription of c-onc genes c-ras and c-fms during mouse development, *Mol. Cell Biol.*, **3**, 1062—1069.
 123. Mushinski J. F., Bauer S. R., Potter M., Reddy E. P. (1983). Increased expression of myc-related oncogene mRNA characterizes most BALB/c plasmacytomas induced by pristane or Abelson murine leukemia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1073—1077.
 124. Noori-Daloui M. R., Swift R. A., Kung H.-J., Crittenden L. B., Witter R. L. (1981). Specific integration of REV proviruses in avian bursal lymphomas, *Nature*, **294**, 574—576.
 125. Notter M. F. D., Leary J. F., Balduzzi P. C. (1983). Adsorption of Rous sarcoma virus to genetically susceptible and resistant chicken cells studied by laser flow cytometry, *J. Virol.*, **41**, 958—964.
 126. Nusse R., Varmus H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome, *Cell*, **31**, 99—109.
 127. O'Rear J. J., Temin H. M. (1982). Spontaneous changes in nucleotide sequences in proviruses of spleen necrosis virus, an avian retrovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1230—1234.
 128. Oroszlan S., Gilden R. V. (1980). Primary structure analysis of retrovirus proteins, In: *Molecular Biology of RNA Tumor Viruses*, ed by J. R. Stephenson, pp. 299—344, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD.
 129. Ou C. Y., Boone L. R., Koh C. K., Tennant R. W., Yang W. K. (1983). Nucleotide sequences of gag-pol regions that determine the FV-1 host range property of BALB/c N-tropic and B-tropic murine leukemia viruses, *J. Virol.*, **48**, 779—784.
 130. Panet A., Haseltine W. A., Baltimore D., Peters G., Harada F., Darlberg J. E. (1975). Specific binding of tryptophan transfer RNA to avian myeloblastosis virus RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2535—2539.
 131. Panganiban A. T., Temin H. M. (1983). The terminal nucleotides of retro-

- virus DNA are required for integration but not virus production, *Nature*, **306**, 155—160.
132. *Papkoﬀ J., Nigg E. A., Hunter T.* (1983). The transforming protein of Moloney murine sarcoma virus is a soluble cytoplasmic protein, *Cell*, **33**, 161—172.
 133. *Payne G. S., Courtneige S. A., Crittenden L. B., Fadly L. B., Bishop J. M., Varmus H. E.* (1981). Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: Viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state, *Cell*, **23**, 311—322.
 134. *Payvar F., DeFranco D., Firestone G. L., Edgar B., Wrange O., Okret S., Gustafsson J.-A., Yamamoto K. R.* (1983). Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region, *Cell*, **35**, 381—392.
 135. *Peters G., Bookes S., Smith R., Dickson C.* (1983). Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: Evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors, *Cell*, **33**, 369—377.
 136. *Pfeiffer P., Hohn T.* (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: A detailed model and test of some aspects, *Cell*, **33**, 781—789.
 137. *Pincus T.* (1980). The endogenous murine type C viruses. In: *Molecular Biology of RNA Tumor Viruses*, ed. by J. Stephenson, pp. 77—130, Academic Press, New York.
 138. *Pinter A., Honner W. J.* (1983). Topography of murine leukemia virus envelope proteins: Characterization of transmembrane components, *J. Virol.*, **46**, 1056—1060.
 139. *Popovic M., Lange-Wantzin G., Sarin P. S., Mann D., Gallo R. C.* (1983). Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5402—5406.
 140. *Prywes R., Foulkes J. G., Rosenberg N., Baltimore D.* (1983). Sequences of the A-MuLV protein needed for fibroblast and lymphoid cell transformation, *Cell*, **34**, 569—579.
 141. *Rein A.* (1982). Interference grouping in murine leukemia viruses: A distinct receptor of the MCF-recombinant viruses in mouse cells, *Virology*, **120**, 251—257.
 142. *Reitz M. S., Jr., Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gallo R. C.* (1981). Characterization and distribution of nucleic acid sequences of a novel type C retrovirus isolated from neoplastic human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1887—1891.
 143. *Robbins K. C., Antoniadis H. N., Devare S. G., Hunkapiller M. W., Aaronson S. A.* (1983). Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet derived growth factor, *Nature*, **305**, 605—608.
 144. *Robinson H. L., Astrin S. M., Senior A. M., Salzar F. H.* (1981). Host susceptibility to endogenous viruses: Defective, glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections, *J. Virol.*, **40**, 745—751.
 145. *Robinson H. L., Blais B. M., Tsichlis P. N., Coffin J. M.* (1982). At least two regions of the viral genome determine the oncogenic potential of avian leukosis viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1225—1229.
 146. *Rothenberg E., Smotkin D., Baltimore D., Weinberg R. A.* (1977). In vitro synthesis of infectious DNA of murine leukemia virus, *Nature*, **269**, 122—126.
 147. *Rous P.* (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells, *J. Exp. Med.*, **13**, 397—413.
 148. *Rowe W. P.* (1978). Leukemia virus genomes in the chromosomal DNA of the mouse, *Harvey Lect.*, **71**, 173—192.
 149. *Rowe W. P., Kozak C. A.* (1980). Germ-line reinsertions of AKR murine

- leukemia virus genomes in Akv-1 congenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4871—4874.
150. Rubin H. (1964). Virus defectiveness and cell transformation in the Rous sarcoma, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64** (supl. 1), 173—180.
 151. Ruley H. E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture, *Nature*, **304**, 602—606.
 152. Sabran J. L., Hsu T. W., Yeater C., Kaji A., Mason W. S., Taylor J. M. (1979). Analysis of integrated avian RNA tumor virus DNA in transformed chicken, duck, and quail fibroblasts, *J. Virol.*, **29**, 170—178.
 153. Scheidereit C., Geisse S., Westphal H. M., Beato M. (1983). The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus, *Nature*, **304**, 749—752.
 154. Schnieke A., Harbers K., Jaenisch R. (1983). Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the $\alpha 1(I)$ collagen gene, *Nature*, **304**, 315—320.
 155. Schwartz D. E., Tizard R., Gilbert W. (1983). Nucleotide sequences of Rous sarcoma virus, *Cell*, **32**, 852—869.
 156. Schwartz D. E., Zameonick P. C., Weith H. L. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: The 3' sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 994—998.
 157. Schwartzberg P., Colicelli J., Goff S. P. (1983). Deletion mutants of Moloney murine leukemia virus which lack glycosylated *gag* protein are replication competent, *J. Virol.*, **46**, 538—546.
 158. Seiki M., Hattori S., Hirayama Y., Yoshida M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3618—3622.
 159. Shank P. R., Varmus H. E. (1978). Virus-specific DNA in the cytoplasm of avian sarcoma virus-infected cells is a precursor to covalently closed circular viral DNA in the nucleus, *J. Virol.*, **25**, 104—114.
 160. Shank P. R., Hughes S. H., Kung H.-J., Majors J. E., Quintrell N., Gutaka R. V., Bishop J. M., Varmus H. E. (1978). Mapping unintegrated avian sarcoma virus DNA: Termini of linear DNA bear 300 nucleotides present once or twice in two species of circular DNA, *Cell*, **15**, 1383—1395.
 161. Shapiro J. A., ed. (1983). *Mobile Genetic Elements*, Academic Press, New York.
 162. Shiba T., Saigo K. (1983). Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*, *Nature*, **302**, 119—124.
 163. Shimotohno K., Temin H. M. (1980). No apparent nucleotide sequence specificity in cellular DNA juxtaposed to retrovirus proviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7357—7361.
 164. Shimotohno K., Temin H. M. (1981). Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus, *Cell*, **26**, 67—78.
 165. Shinnick T. M., Lerner R. A., Sutcliffe J. G. (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus, *Nature*, **293**, 543—548.
 166. Sigurdsson B. (1954). Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: An epizootological and Pathological study, *Br. Vet. J.*, **110**, 255—270.
 167. Simon D., Stuhlmann H., Jahner D., Wagner H., Werner E., Jaenisch R. (1983). Retrovirus genomes methylated by mammalian but not bacterial methylase are non-infectious, *Nature*, **304**, 275—277.
 168. Sorge J., Ricci W., Hughes S. H. (1983). *cis*-acting RNA packing locus in the 115-nucleotide direct repeat of Rous sarcoma virus, *J. Virol.*, **48**, 667—675.
 169. Stephenson J. R., ed. (1980). *Molecular Biology of RNA Tumor Viruses*, Academic Press, New York.

170. *Stephenson J. R.* (1980). Type C virus structural and transformation-specific proteins, In: *Molecular Biology of RNA Tumor Viruses*, ed. by J. R. Stephenson, pp. 245—297, Academic Press, New York.
171. *Summers J., Mason W. S.* (1982). Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate, *Cell*, **29**, 403—415.
172. *Swanstrom R., Parker R. C., Varmus H. E., Bishop J. M.* (1983). Transduction of a cellular oncogene: The genesis of Rous sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2519—2523.
173. *Tabin C. J., Bradley S. M., Bargmann C. I., Weinberg R. A., Papageorge A. G., Scolnick E. M., Dhar R., Lowy D. R., Chang E. H.* (1982). Mechanism of activation of a human oncogene, *Nature*, **300**, 143—149.
174. *Takeya T., Hanafusa H.* (1983). Structure and sequence of the cellular gene homologous to the PSV *src* gene and the mechanism for generating and transforming virus, *Cell*, **32**, 881—890.
175. *Taparowsky E., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M.* (1983). Structure and activation of the human *N-ras* gene, *Cell*, **34**, 581—586.
176. *Taylor J. M.* (1977). An analysis of the role of tRNA species as primers for the transcription into DNA of RNA tumor virus genomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 57—71.
177. *Taylor J. M., Hsu T. W.* (1980). Reverse transcription of avian sarcoma virus RNA might involve copying of the tRNA primer, *J. Virol.*, **33**, 531—534.
178. *Teich N.* (1982). Taxonomy of retroviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus, and J. M. Coffin, pp. 25—207, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
179. *Teich N., Bernstein A., Mak T., Wyke J., Hardy W.* (1982). Pathogenesis of retrovirus-induced disease. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus, and J. M. Coffin, pp. 785—998, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
180. *Temin H.* (1963). The effects of actinomycin D on growth of Rous sarcoma virus in vitro, *Virology*, **20**, 577—582.
181. *Temin H. M.* (1964). Nature of the provirus of Rous sarcoma, *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **17**, 557—570.
182. *Temin H. M.* (1981). Structure, variation and synthesis of retrovirus long terminal repeat, *Cell*, **27**, 1—3.
183. *Temin H. M., Mizutani S.* (1970). RNA-directed DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, *Nature*, **226**, 1211—1213.
184. *Todaro G. J.* (1980). Interspecies transmission of mammalian retroviruses, In: *Molecular Biology of RNA Tumor Viruses*, ed. by J. R. Stephenson, pp. 47—76, Academic Press, New York.
185. *Tsichlis P. N., Strauss P. G., Hu L. F.* (1983). A common region for proviral DNA integration in MoMuLV-induced rat thymic lymphomas, *Nature*, **302**, 445—449.
186. *Van Beveren C., van Straaten F., Galleshaw J. A., Verma I. M.* (1981). Nucleotide sequence of the genome of a murine sarcoma virus, *Cell*, **27**, 97—108.
187. *Van Beveren C., Rands E., Chattopadhyay S. K., Lowy D. R., Verma I. M.* (1982). Long terminal repeat of murine retroviral DNAs: Sequence analysis, host-proviral junctions and preintegration site, *J. Virol.*, **41**, 542—556.
188. *Van Ooyen A. J. J., Michalides R. J. A. M., Nusse R.* (1983). Structural analysis of a 1.7-kilobase mouse mammary tumor virus-specific RNA, *J. Virol.*, **46**, 362—370.
189. *Varmus H. E., Swanstrom R.* (1982). Replication of retroviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus,

- and J. M. Coffin, pp. 369—512, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
190. Varmus H. E., Quintrell N., Oritz S. (1981). Retroviruses as mutagens: Insertion and excision of a nontransforming provirus after expression of a resident transforming provirus, *Cell*, **25**, 23—36.
 191. Varmus H. E., Padgett T., Healsey S., Simon G., Bishop J. M. (1977). Cellular functions are required for the synthesis and integration of avian sarcoma virus-specific DNA, *Cell*, **11**, 307—319.
 192. Varmus H. E., Heäalsey S., Kung H.-J., Oppermann H., Smith V. C., Bishop J. M., Shank P. R. (1978). Kinetics of synthesis, structure and purification of avian sarcoma virus-specific DNA made in the cytoplasm of acutely infected cells, *J. Mol. Biol.*, **120**, 55—82.
 193. Verma I. M. (1977). The reverse transcriptase, *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 1—38.
 194. Vogt P. K. (1977). Genetics of RNA tumor viruses. In: *Comprehensive Virology*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 341—455, Plenum Press, New York.
 195. Watanabe S., Temin H. M. (1983). Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors, *Mol Cell Biol.*, **3**, 2241—2249.
 196. Waterfield M. D., Scrace G. T., Whittle N., Stroobant P., Johnsson A., Wasteson A., Westermark B., Sheldin C.-H., Huang J. S., Deuel T. F. (1983). Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{sis} of simian sarcoma virus, *Nature*, **304**, 35—39.
 197. Weber M. J., Rubsamen H., Friis R. R. (1981). Lack of correlation between pp60^{src} kinase activity and transformation parameters in cells infected with temperature conditional mutants of Rous sarcoma virus, *J. Gen. Virol.*, **52**, 395—399.
 198. Wei C.-M., Gibson M., Spear P. G., Scolnick E. M. (1981). Construction and isolation of transmissible retrovirus containing the *src* gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type I, *J. Virol.*, **39**, 935—944.
 199. Weiss R. A. (1982). Experimental biology and assay of retroviruses In: *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, ed. by R. A. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus, and J. M. Coffin, pp. 209—260, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 200. Weiss R. A., Teich N., Varmus H. E., Coffin J. M., eds. (1982). *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 201. Wheeler D. A., Butel J. S., Medina D., Cardiff R. D., Hager G. L. (1983). Transcription of mouse mammary tumor virus: Identification of a candidate mRNA for the long terminal repeat gene product, *J. Virol.*, **46**, 42—49.
 202. Willingham M. C., Jay G., Pastan I. (1979). Localization of the ASV *src* gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry, *Cell*, **18**, 125—134.
 203. Willingham M. C., Pastan I., Shih T. Y., Scolnick E. M. (1980). Localization of the *src* gene product of the Harvey strain of MSV to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry, *Cell*, **19**, 1005—1014.
 204. Witte O. N., Rosenberg N., Baltimore D. (1979). Preparation of syngeneic tumor regressor serum reactive with the unique determinants of the Abelson murine leukemia virus-encoded P120 protein at the cell surface, *J. Virol.*, **31**, 776—784.
 205. Wood T. G., McGeadey M. L., Blair D. G., Vande Woude G. F. (1983). Long terminal repeat enhancement of *v-mos* transforming activity: Identification of essential regions, *J. Virol.*, **46**, 726—736.
 206. Yamamoto T., Hihara H., Nishida T., Kawai S., Toyoshima K. (1983). A new

- avian erythroblastosis virus, AEV-H carries *erbB* gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas, Cell, 34, 225—232.
207. Yamamoto T., Nishida T., Miyajima N., Kawai S., Ooi T., Toyoshima K. (1983). The *erbB* gene of avian erythroblastosis virus is a member of the *src* gene family, Cell, 35, 71—78.
208. Yoshimura F. K., Levine K. L. (1983). AKR thymic lymphomas involving milk cell focus inducing murine leukemia viruses have a common region of provirus integration, J. Virol., 45, 576—584.

Список сокращений вирусов

AAV	аденоассоциированные вирусы
AEV	вирус эритробластога птиц
ALV	вирус лейкоза птиц
BEV	эндогенный вирус павианов
BLV	вирус лейкоза крупного рогатого скота
BPV	вирус папилломы крупного рогатого скота
CPV	вирус хронического паралича (пчел)
CPVA	вирус, сопутствующий хроническому параличу (пчел)
CRPV	вирус папилломы кролика
DHBV	вирус гепатита В уток
ESV	вирус герпеса лошадей
FeLV	вирус лейкоза кошек
FeLV	вирус саркомы кошек
GALV	вирус лейкоза гиббонов
GSHV	вирус гепатита В земляных белок
HAV	вирус гепатита А
HBV	вирус гепатита В
HCMV	цитомегаловирус человека
HPV	вирус папилломы человека
HSV	вирус простого герпеса
HTLV	вирус Т-клеточного лейкоза человека
LCMV	вирус лимфоцитарного хориоменингита
MDV	вирус болезни Марек
MMTV	вирус опухоли молочных желез мышей
MPMV	вирус обезьян Мезон — Пфайзера
MuLV	вирус лейкоза мышей
MuSV	вирус саркомы мышей
REV	вирус ретикулоэндотелиоза птиц
RSV	вирус саркомы Рауса
SBMV	вирус мозаики южных бобов
SFFV	вирус Френд, вызывающий образование фокусов в селезенке
SFV	вирус леса Семлики
SSV	вирус саркомы обезьян

STNV	вирус-сателлит вируса некроза табака
SV40	обезьяний вирус 40
TBSN	вирус кустистой карликовости томатов
TMV	вирус табачной мозаики
VSV	вирус везикулярного стоматита
VZV	вирус ветрянки/опоясывающего лишая
WHV	вирус гепатита В североамериканского лесного сурка

Оглавление

Предисловие редакторов перевода	5
Предисловие	8
Благодарности	9
Глава 1. Введение. <i>Бернард Н. Филдс, Дэвид М. Найп</i>	10
Введение в вирусологию животных	10
История методов и концепций в вирусологии	12
Системы животного-хозяина	12
Культура клеток	13
Бактериальные вирусы и генетика бактерий	13
Индукция опухолей вирусами	14
Биохимия и молекулярная биология	15
Электронная микроскопия и ультраструктура	16
Иммунология	16
Профилактика и лечение	17
Литература	18
Глава 2. Таксономия вирусов. <i>Фредерик А. Мэрфи</i>	20
Предыстория	20
Универсальная система таксономии вирусов МКТВ	21
Семейства вирусов	22
Роды вирусов	22
Виды вирусов	22
Определение видов в семействе Adenoviridae	23
Однозначная идентификация вирусов	23
Характеристики вирусов	24
Семейства, включающие вирусы человека и животных	25
Таксономическое описание семейств, включающих вирусы человека и животных	26
Семейство: Poxviridae [15] (поксвирусы)	26
Семейство: Iridoviridae [15] (иридовирусы)	28
Семейство: Herpesviridae [24] (вирусы герпеса)	29
Семейство: Adenoviridae [20, 29] (аденовирусы)	31
Семейство: Parovaviridae [17] (паповавирусы)	32
Предполагаемое семейство: [Hepadnaviridae] [23] (вирусы, подобные вирусу гепатита В)	34
Семейство: Parvoviridae [3] (парвовирусы)	35
Семейство: Reoviridae [15] (реовирусы)	37
Предполагаемое семейство: [Birnaviridae] [15] (вирусы с двухцепочечной РНК, состоящей из двух сегментов)	38
Семейство: Togaviridae [22] (тогавирусы)	38

Семейство: Coronaviridae [26] (коронавирусы)	40
Семейство: Paramyxoviridae [12] (парамиксовирусы)	41
Семейство: Rhabdoviridae [5] (рабдовирусы)	42
Предполагаемое семейство: [Filoviridae] [11] (вирусы Марбург и Эбола)	44
Семейство: Orthomyxoviridae [7] (вирусы гриппа)	45
Семейство: Bunyaviridae [4] (буньявирусы)	46
Семейство: Arenaviridae [21] (аренавирусы)	47
Семейство: Retroviridae [27] (ретровирусы)	48
Семейство: Picornaviridae [6] (пикорнавирусы)	49
Семейство: Caliciviridae [25] (калицивирусы)	51
Литература	52
Глава 3. Принципы структурной организации вирусов.	
<i>Стефен Харрисон</i>	54
Типы структур	54
Принципы структурной организации вирусов	56
Симметрия вирусных частиц	58
Спиральная симметрия	58
Икосаэдрическая симметрия	59
Примеры вирусных структур	64
TMV	65
Вирус кустистой карликовости томатов (TBSV) и родственные вирусы	70
Полиовирусы и родственные вирусы	74
Вирус везикулярного стоматита (VSV)	75
Папавирусы	77
Аденовирусы	79
Проникновение вируса в клетку и его разборка	81
Литература	81
Глава 4. Оболочки вирусов. Дон Уайли	84
Архитектура и почкование вирусов, имеющих оболочку	84
Вирусные оболочки	86
Оболочка вируса Синдбис	86
Оболочка вируса Укуниемеи	89
Оболочка вируса гриппа С	90
Белки вирусных оболочек	92
Белки оболочек: введение	92
Трехмерная структура вирусных гликопротеинов	100
Функции вирусных мембранных гликопротеинов	103
Литература	117
Глава 5. Размножение вирусов: общие представления.	
<i>Бернард Ройзман</i>	124
Начало инфекции	127
Прикрепление	127
Проникновение	128
Раздевание	128
Стратегия размножения вируса	129
Требования и ограничения	129
Кодирование и организация вирусного генома	130
Экспрессия и репликация вирусного генома	130
Сборка, созревание и выход вирусов из зараженных клеток	136

Глава 6. Формирование и репликация дефектных вирусных геномов. Джон Дж. Холланд	138
Природа дефектных вирусных геномов	138
Дефектные геномы, зависящие от вируса-помощника	138
Интегрированные дефектные вирусные геномы	144
Вирусы-сателлиты	146
Псевдовирioны	148
Условно-дефектные геномы	148
Структуры ДИ-геномов: механизм образования и интерференция	149
РНК-содержащие вирусы	149
ДНК-содержащие вирусы	165
Биологическая роль дефектных геномов	169
Перенос генов и экспрессия	169
ДИ-частицы и вирусы-сателлиты как фактор регуляции летальности, вызванной вирулентным вирусом	171
Участие дефектных геномов в эволюции вируса и клетки-хозяина	172
Краткое содержание	174
Литература	175
 Глава 7. Основы генетики вирусов животных. Роберт Ф. Рэмиз	 183
Генетическая методология	184
Мутации	185
Спонтанная мутация	186
Индукцированные мутации	187
Типы мутантов	188
Использование <i>ts</i> -мутантов для анализа функций гена	191
Генетические взаимодействия между вирусами	192
Комплементация	193
Рекомбинация	196
Механизмы рекомбинации	207
Генетическая реактивация	209
Негенетические взаимодействия между вирусами	209
Гетерозиготность	209
Интерференция	210
Супрессия	211
Фенотипическое смешивание	213
Дефектность	214
Взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином	215
Трансформация	215
Интеграция	217
Персистентная инфекция	218
Картирование вирусных геномов	219
Генетическое картирование	219
Физические и биохимические карты	220
Генная инженерия и генетика вирусов	223
Изучение экспрессии вирусных генов	224
Сайт-специфический мутагенез	224
Итоги и перспективы	225
Литература	225

Глава 8. Молекулярная генетика вирусов животных. Дэвид М. Найн	235
Клонирование рекомбинантных структур вирусных ДНК	235
Экспрессия вирусных ДНК в <i>Escherichia coli</i>	237
Экспрессия вирусных генов в дрожжевых клетках	239
Экспрессия вирусных генов в клетках млекопитающих	240
Введение клонированных вирусных генов в родительский вирусный геном	241
Использование вирусных геномов в качестве векторов	244
Временная экспрессия вирусных генов в эукариотических клетках	247
Стабильная интеграция вирусных генов с клеточным геномом	248
Мутагенез вирусных ДНК <i>in vitro</i>	250
Введение делеционных мутаций	251
Введение точечных мутаций	253
Включение последовательностей вирусных ДНК в новые сайты вирусного генома	254
Селекция вирусных мутантов с изменениями в определенных белках	255
Заключение	256
Литература	256
Глава 9. Эпидемиология: механизм возникновения, распространения и передачи вирусных инфекций. Роберт Шоуп	264
Методы, используемые в эпидемиологии	265
Серологическая эпидемиология	265
Молекулярная эпидемиология	266
Экологическая эпидемиология	267
Модели инфекции	268
Прямая передача от человека к человеку	269
Передача от человека к человеку вируса от носителей	270
Передача членистоногими	271
Зоонозная инфекция с передачей вируса от животного человеку	272
Передача, для которой в человеческом резервуаре необходим другой вирус	273
Происхождение новых вирусов	273
Литература	276
Глава 10. Патогенез вирусных инфекций. Роберт С. Кауфман и Бернард Н. Филдс	277
Общие принципы вирусного патогенеза	278
Специфические стадии вирусного патогенеза	280
Проникновение вируса в организм хозяина	280
Первичная репликация	281
Распространение вируса	282
Сродство вирусов к клеткам и тканям и клеточные рецепторы	284
Повреждение клеток	286
Иммунный ответ и другие факторы защиты хозяина	289
Персистенция вируса, латентность и медленные инфекции	294

Краткое содержание	297
Литература	298

Глава 11. Метаболизм вирусов и клеточная архитектура.

<i>Шелдон Пенмен</i>	307
Цитоплазматический и ядерный скелет	307
Метаболизм вирусов и клеточные структуры	313
Полиовирус — цитоплазматический вирус, лишенный оболочки	315
Вирус везикулярного стоматита — цитоплазматический РНК-содержащий вирус с оболочкой	318
SV40 ядерный вирус, лишенный оболочки	320
Аденовирус — крупный ядерный вирус, лишенный оболочки	322
Вирус герпеса — ядерный вирус, снабженный оболочкой	323
Общие представления об архитектурных аспектах метаболизма вирусов	324
Литература	326

Глава 12. Трансформация и онкогенез: ДНК-содержащие вирусы. *Морис Грин*

Введение и краткий обзор	329
Вирусология опухолей	329
Классификация ДНК-содержащих опухолеродных вирусов	330
Свойства ДНК-содержащих опухолеродных вирусов	332
Трансформация клеток	333
Полиомавирусы	334
Папилломавирусы	336
Аденовирусы	336
Герпесвирусы	337
HBV-подобные вирусы	339
Сходные функции трансформирующих генов опухолеродных ДНК-вирусов, онкогенов ретровирусов и онкогенов раковых клеток	340
Природный и экспериментальный онкогенез и трансформация клетки опухолеродными ДНК-вирусами	341
Общие свойства трансформированных клеток	341
Полиомавирусы	343
Папилломавирусы	345
Аденовирусы	353
Герпесвирусы	356
HBV-подобные вирусы	363
Молекулярная биология трансформации клеток опухолеродными ДНК-содержащими вирусами	363
Полиомавирусы	366
Папилломавирусы	376
Аденовирусы	384
Герпесвирусы	401
HBV-подобные вирусы	407
Пути онкогенеза и трансформации клеток под действием трансформирующих генов опухолеродных ДНК-вирусов, онкогенов ретровирусов и раковых клеток, а также химических канцерогенов: общие особенности вирусологии опухолей	410
Литература	415

Глава 13. Трансформация и онкогенез: ретровирусы. Дуглас Р. Лоуи	433
Введение	433
Первые изоляты ретровирусов	434
Необычные свойства ретровирусов	434
Структура вириона	436
Классификация	437
Подсемейства	437
Принадлежность к виду-хозяину	439
Морфология и морфогенез вирионов	439
Генетический состав	440
Спектр хозяев	445
Вирусная интерференция	447
Распространение ретровирусов	447
Введение к вирусной репликации	448
Фаза I: ранние события	449
Фаза II: синтез неинтегрированной (свободной) вирусной ДНК	449
Обратная транскриптаза	451
Вирусная РНК	453
Синтез вирусной ДНК	455
Фаза III: интеграция вирусной ДНК	457
Фаза IV: экспрессия вирусной ДНК	459
Фаза V: синтез вирусных белков и сборка вирионов	462
Эндогенные вирусы	463
Рекомбинация ретровирусов	464
Мутагенез, индуцированный вирусом	465
Патогенность v-onc ⁻ -вирусов	468
Патогенность v-onc ⁺ -вирусов	473
Клеточные трансформирующие гены	474
Заключение	475
Литература	475
Список сокращений вирусов	487

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Учебное издание

Бернард Филдс, Дэвид Найп, Фредерик Мэрфи и др.

ВИРУСОЛОГИЯ

Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа при участии Р. Ченока, Б. Ройзмана, Дж. Мелника, Р. Шоупа

В 3-х томах

Том 1

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев

Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова

Ст. научный редактор Н. Н. Шафрановская

Научный редактор Т. И. Пономарева

Мл. редактор И. А. Деменцова

Художник В. Е. Карнов

Художественный редактор А. Я. Мусин

Технический редактор И. М. Кренделева

Корректор С. С. Суставова

ИБ № 6729

Сдано в набор 30.09.88. Подписано к печати 06.02.89. Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 1. Печать высокая. Гарнитура латинская. Объем 15,50 бум. л. Усл. печ. л. 31. Усл. кр.-отт. 31. Уч.-изд. л. 33,60. Изд. № 4/5840. Тираж 12 800 экз. Зак. № 555. Цена 3 руб.

Издательство «МИР» В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 113105, Москва, Нагатинская ул., 1.

ка,

га
л.
кз.

по

те



1

BRUNSON
BRUNSON

